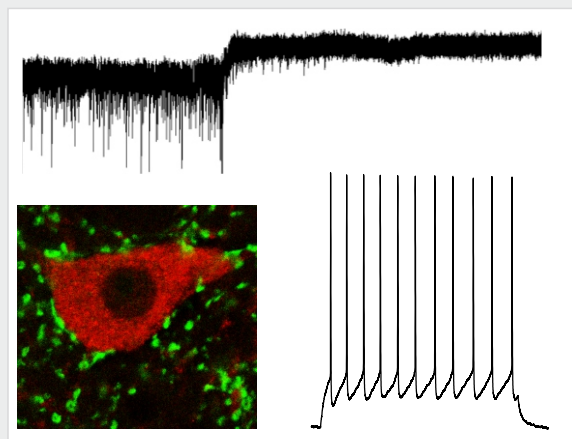
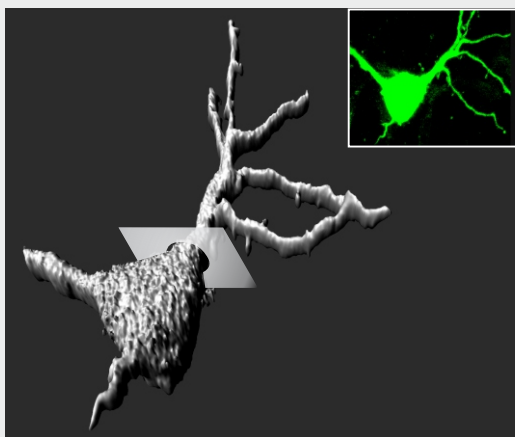




**Departamento de Fisiología**

**MODULACIÓN SINÁPTICA DEL UMBRAL DE RECLUTAMIENTO  
Y DE LA FRECUENCIA DE POTENCIALES DE ACCIÓN  
EN LAS MOTONEURONAS OCULARES**

**SYNAPTIC MODULATION OF RECRUITMENT THRESHOLD  
AND FIRING RATE IN RAT OCULOMOTOR  
NUCLEUS MOTONEURONS**



**Tesis Doctoral  
Julio Torres Torrelo  
Sevilla, 2014**





MODULACIÓN SINÁPTICA DEL UMBRAL DE RECLUTAMIENTO Y  
DE LA FRECUENCIA DE POTENCIALES DE ACCIÓN EN LAS  
MOTONEURONAS OCULARES

SYNAPTIC MODULATION OF RECRUITMENT THRESHOLD  
AND FIRING RATE IN RAT OCULOMOTOR  
NUCLEUS MOTONEURONS

Departamento de Fisiología

Julio Torres Torrelo

2014





MODULACIÓN SINÁPTICA DEL UMBRAL DE RECLUTAMIENTO Y  
DE LA FRECUENCIA DE POTENCIALES DE ACCIÓN EN LAS  
MOTONEURONAS OCULARES

SYNAPTIC MODULATION OF RECRUITMENT THRESHOLD  
AND FIRING RATE IN RAT OCULOMOTOR  
NUCLEUS MOTONEURONS

Memoria presentada por el Licenciado D. Julio Torres Torrelo para optar  
al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Directores de la Tesis

Fdo. Livia Carrascal Moreno  
Profesora Contratada a Doctora  
Dpto. de Fisiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla

Fdo. Blas Torres Ruiz  
Profesor Catedrático  
Dpto. de Fisiología  
Facultad de Biología  
Universidad de Sevilla



## AGRADECIMIENTOS

Sé que en pocas líneas no seré capaz de expresar lo agradecido que me siento a estas personas por estar a mi lado durante estos cuatro años maravillosos. Aún así, trataré de dedicarles algunas palabras siendo consciente de que mis sentimientos van más allá de lo que pueda ahora escribir.

A mi director de tesis y mi padre, el Dr. Blas Torres Ruiz, por darme la oportunidad de entrar en el campo de la investigación. Por tener siempre una solución a los problemas, por realizar propuestas innovadoras, por tu fuerza y tu talento. Porque este trabajo de tesis ha conseguido que sea mejor profesional y mejor persona. Esto se lo debo a la apuesta personal de mi padre. Tú pusiste la primera piedra en el camino y esto nunca lo olvidaré. Gracias por confiar en mí.

A mi directora de tesis, la Dra. Livia Carrascal Moreno, por ser mi compañera, la “hermana” mayor que nunca tuve, mi amiga. Por haberte volcado en esta tesis totalmente, porque siempre supe que estabas ahí, porque este trabajo también es tuyo. Si aquí describiera todo lo que he aprendido, desde el punto de vista conceptual y procedimental de ti, no acabaría. Por todo esto y mucho más, gracias Livi.

Al Dr. Luis Herrero y la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Luque Lao, por ser mis compañeros, por estar siempre a mi lado, por compartir tantas risas y buenos ratos juntos. Ha sido un lujo trabajar con vosotros.

A “Mawy”, por ser la luz, la sonrisa y la vitalidad de nuestro grupo del departamento. Sé que muchos ya te echan de menos. En estos años, hubo momentos duros donde pensaba que los experimentos no saldrían. Tú alegría conseguía que viese cosas positivas en situaciones complicadas. Desde aquí me gustaría felicitarte porque, en lo que a mi tesis se refiere, has hecho un trabajo excelente.

A David, por trabajar de una forma tan brillante conmigo en el que quizás, fue el año más difícil de este periodo. Poner a andar el setup de registro intracelular para dos inexpertos como éramos nosotros, fue una tarea casi “imposible” pero al mismo tiempo muy enriquecedora. Tú siempre confiabas en que lo conseguiríamos y así fue.

Al Dr. Pedro Núñez Abades, por estar cuando que te he necesitado y por la fisiología que me has enseñado.

A las Dras. María Rosario Pásaro y Susana Pilar Gaitán, por abrirme las puertas del grupo con todo vuestro cariño. Me he sentido muy respaldado por vosotras este tiempo.

A M<sup>a</sup> Ángeles Bueso y Rosa M<sup>a</sup> Giráldez, por amenizar el trabajo y porque sentí vuestra compañía en esos días en los que las jornadas eran más largas.

Al Dr. Ángel Pastor y todo su grupo, por tenderme la mano, porque me recibisteis desde el primer momento como a uno más, por vuestra ayuda.

A Alfonso, M<sup>a</sup> José y Joaquín por ayudarme siempre que lo necesité.

A Zafar Bashir, mi supervisor y la persona que permitió que realizara mi estancia en la Universidad de medicina de Bristol. Ha sido una experiencia muy positiva. A Paul, Jasmine, Masha, Marie y Ellen, mis compañeros y amigos de laboratorio. Ellos me acogieron como un “inglés” más en su magnífico grupo.

A mis amigos Marcos, Carlos y Chío porque los considero de mi familia, porque son mis confidentes, porque a pesar de la distancia que nos ha separado en determinados momentos yo siempre os he sentido muy cerca. Por interesaros continuamente por cómo evolucionaba mi trabajo sin entender casi nada de lo que estaba haciendo.

A mi madre, por ser una persona admirada y querida por todos los que conozco. Por preocuparte por mí en cada instante. Por hacerme la vida tan fácil. Por haber sido paciente en aquellos días que no fueron buenos para mí. Un cachito de este trabajo también es tuyo, estoy seguro. A mi hermana Tere, por ser el “sol” que brilla en mi casa. A mi hermana Horten, porque para mí ha sido un privilegio y un placer poder compartir contigo algunos ratos en el laboratorio. Desde aquí quiero dedicarte la mayor de las suertes en el reto que has emprendido recientemente. Eres muy buena en lo que haces y sé que lo conseguirás.

A Cristina, porque cuando empecé eras mi novia y ahora eres mi mujer y compañera de vida. Por tu paciencia, por escucharme, por ser tan especial, por ser el motor de mis piernas y de mi mente cada día, por ser el pilar más importante sobre el que me sostengo. Yo saqué fuerzas cuando no las tenía porque pensaba en ti. Gracias por quererme como soy, con mis virtudes y defectos. Por darme tú apoyo incondicional en cada una de las decisiones que he ido y voy tomando. Sabes que me siento el más afortunado por tenerte a mi lado. Te quiero.

Porque sin vosotros esto no hubiera sido posible. GRACIAS.

*"Cuando quieres algo, todo el Universo conspira para que realices tu deseo."*

*El Alquimista*

*Paulo Coelho*



---

**CONTENIDO**

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Consideraciones generales .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. La musculatura extraocular .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Los movimientos oculares .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. Las motoneuronas de los músculos extraoculares .....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Morfología .....	16
2.4.2. Fisiología de las motoneuronas en preparaciones en alerta .....	18
2.4.3. Fisiología de las motoneuronas en preparaciones in vitro.....	20
<b>2.5. El principio del tamaño en motoneuronas .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6. El sistema premotor ocular .....</b>	<b>25</b>
2.6.1. Aferencias a los núcleos motores oculares.....	25
2.6.2. Circuito generador del movimiento sacádico y de la fijación ocular.....	28
<b>2.7. Neurotransmisores .....</b>	<b>29</b>
2.7.1. Modulación de la excitabilidad por neurotransmisores .....	33
2.7.2. Receptores de glutamato .....	33
2.7.3. Receptores de GABA .....	35
<b>3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Planteamientos y objetivos generales .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>42</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Sujetos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Preparaciones de rodajas cerebrales .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Soluciones farmacológicas .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4. Registros electrofisiológicos y análisis de la condiciones control vs glutamato .....</b>	<b>46</b>
4.4.1. Registros electrofisiológicos .....	46
4.4.2. Análisis de los registros electrofisiológicos .....	48

<b>4.5. Registros electrofisiológicos de patch clamp en la configuración de whole cell en las condiciones control vs GABA .....</b>	<b>52</b>
4.5.1. Registro de fijación de voltaje y análisis.....	54
4.5.2. Registro de fijación de corriente y análisis .....	56
<b>4.6. Marcaje intracelular y reconstrucción .....</b>	<b>56</b>
<b>4.7. Inmunohistoquímica del VGLUT y VGAT .....</b>	<b>56</b>
<b>4.8. Análisis estadístico.....</b>	<b>57</b>
 <b>5. RESULTADOS .....</b>	 <b>59</b>
<b>5.1. Identificación de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2. Principio del tamaño en las motoneuronas del núcleo motor ocular común.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3. Efectos del glutamato sobre la excitabilidad de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.....</b>	<b>64</b>
5.3.1. Entradas sinápticas glutamatérgicas al núcleo motor ocular común: determinación inmunohistoquímica .....	64
5.3.2. Efectos del glutamato sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada .....	65
5.3.3. Efectos del glutamato sobre la reobase y el voltaje de despolarización .....	67
5.3.4. Efectos del glutamato sobre la frecuencia tónica de disparo .....	69
5.3.5. Efectos del glutamato sobre el componente fásico del disparo repetitivo.....	72
5.3.6. Efectos del glutamato sobre el índice de adaptación de la frecuencia de disparo repetitivo.....	74
<b>5.4. Efectos del GABA sobre la excitabilidad de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.....</b>	<b>76</b>
5.4.1. Entradas sinápticas GABAérgicas y corrientes mediadas por los receptores de GABA <sub>A</sub> .....	76
5.4.2. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores de GABA <sub>A</sub> sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada.....	78
5.4.3. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores de GABA <sub>A</sub> sobre la constante de tiempo.....	82
5.4.4. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores de GABA <sub>A</sub> sobre el umbral de reclutamiento.....	83
5.4.5. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores de GABA <sub>A</sub> sobre la relación intensidad de corriente – frecuencia de disparo (I-F) .....	85



---

<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>6.1. Modulación de la excitabilidad neuronal por glutamato y GABA.....</b>	<b>89</b>
<b>6.2. Modulación de la función entrada-salida por glutamato en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.....</b>	<b>90</b>
6.2.1. Determinación del umbral de reclutamiento.....	90
6.2.2. Modulación del umbral de reclutamiento por glutamato .....	90
6.2.3. Modulación de la ganancia de la relación I-F por glutamato .....	92
6.2.4. Modulación del componente fásico de frecuencia de potenciales de acción por glutamato .....	93
6.2.5. Implicaciones funcionales.....	94
<b>6.3. Modulación de la función entrada-salida por GABA en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.....</b>	<b>95</b>
6.3.1. Contribución de los receptores GABA <sub>A</sub> . .....	95
6.3.2. Modulación de la ganancia por GABA .....	96
6.3.3. Modulación del umbral de reclutamiento por GABA.....	97
<b>6.4. Implicaciones funcionales: Un sistema orquestado mediado por glutamato y GABA modula la función entrada-salida de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.....</b>	<b>98</b>
 <b>7. CONCLUSIONES.....</b>	 <b>103</b>
7.1. Conclusiones .....	105
7.2. Conclusions .....	107
 <b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	 <b>110</b>

**FIGURAS****INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 2.1.</b> La musculatura extraocular.....	13
<b>Figura 2.2.</b> Movimientos oculares en la rata .....	17
<b>Figura 2.3.</b> Morfología de las motoneuronas oculares .....	19
<b>Figura 2.4.</b> Fisiología de las motoneuronas oculares.....	22
<b>Figura 2.5.</b> Relación entre la tensión de la unidad motora y el umbral de reclutamiento .....	24
<b>Figura 2.6.</b> Aferencias sinápticas a las motoneuronas extraoculares y movimientos oculares asociados.....	26
<b>Figura 2.7.</b> Circuitos generadores del movimiento sacádico y de la fijación ocular en los planos horizontal y vertical .....	30
<b>Figura 2.8.</b> Estructura y función de los receptores de glutamato.....	36
<b>Figura 2.9.</b> Receptores GABA <sub>A</sub> .....	38

**MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Figura 4.1.</b> Preparación y mantenimiento de rodajas cerebrales, localización de la estructura y elaboración de microelectrodos .....	47
<b>Figura 4.2.</b> Sistema de registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica en los experimentos de glutamato .....	49
<b>Figura 4.3.</b> Análisis de los registros electrofisiológicos de los experimentos de glutamato mediante el programa Diadem .....	51
<b>Figura 4.4.</b> Técnica de patch clamp.....	53
<b>Figura 4.5.</b> Análisis de los registros electrofisiológicos de los experimentos de GABA mediante el programa pClamp .....	55

**RESULTADOS**

<b>Figura 5.1.</b> Identificación funcional de las motoneuronas del núcleo motor ocular común ..	62
<b>Figura 5.2.</b> Relación entre el tamaño de las células, la resistencia de entrada y la reobase de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	63
<b>Figura 5.3.</b> Terminales glutamatérgicos en el núcleo motor ocular común de la rata .....	64
<b>Figura 5.4.</b> Efectos del glutamato (5 $\mu$ M) sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	66
<b>Figura 5.5.</b> Efectos del glutamato sobre la reobase y el voltaje de despolarización en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	68
<b>Figura 5.6.</b> Efectos del glutamato sobre la reobase y el voltaje de despolarización en función del umbral de reclutamiento del disparo repetitivo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	69

<b>Figura 5.7.</b> Efecto del glutamato sobre la frecuencia tónica de disparo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	70
<b>Figura 5.8.</b> Efectos del glutamato sobre la ganancia de la frecuencia tónica y el umbral de reclutamiento del disparo repetitivo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	71
<b>Figura 5.9.</b> Relación de la resistencia de entrada y umbral de reclutamiento en la condición control (A) y durante la exposición a glutamato (B) en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	72
<b>Figura 5.10.</b> Efecto del glutamato sobre la frecuencia fásica de disparo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	73
<b>Figura 5.11.</b> Efecto del glutamato sobre el índice de adaptación en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	75
<b>Figura 5.12.</b> Entradas sinápticas GABAérgicas y corrientes producidas por GABA en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	77
<b>Figura 5.13.</b> Efectos del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	79
<b>Figura 5.14.</b> Efectos del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre la resistencia de entrada de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	81
<b>Figura 5.15.</b> Efectos del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre la constante de tiempo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	82
<b>Figura 5.16.</b> Efectos del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre la reobase de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	84
<b>Figura 5.17.</b> Efectos del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre la relación I-F en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata .....	86

## DISCUSIÓN

<b>Figura 6.1.</b> Mecanismos de modulación de la excitabilidad neuronal.....	89
<b>Figura 6.2.</b> Las entradas sinápticas de glutamato y GABA funcionan de forma orquestada para generar y modular la frecuencia de potenciales de acción en las motoneuronas oculares .....	101

**TABLAS****RESULTADOS**

<b>Tabla 5.1.</b> Efecto del glutamato (5 $\mu$ M) sobre las propiedades intrínsecas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común .....	65
<b>Figura 5.2.</b> Efecto del GABA (100 $\mu$ M) y de la gabazina (20 $\mu$ M) sobre las propiedades intrínsecas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común .....	78

## **1. RESUMEN/ABSTRACT**



### 1.1. Resumen

Las neuronas reciben e integran las señales sinápticas, éstas pueden generar potenciales de acción como mecanismo para transmitir información. La función neuronal de entrada-salida se puede ajustar modificando el umbral de reclutamiento y la ganancia de la relación. Los estudios realizados en preparaciones de animal alerta han demostrado que las motoneuronas de los músculos extraoculares presentan una frecuencia de potenciales de acción fásico-tónica. Esta frecuencia está linealmente relacionada con la velocidad y la posición ocular. Las pendientes de estas relaciones son más altas en las motoneuronas de mayor umbral de reclutamiento y se ha propuesto que esta relación depende de las entradas sinápticas. Por otro lado, estas motoneuronas reciben abundantes entrada sinápticas, mediadas por los neurotransmisores glutamato y ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), desde diferentes núcleos premotores. Este trabajo ha investigado la modulación del umbral de reclutamiento y la ganancia (pendiente de la relación entre intensidad de corriente inyectada y frecuencia de potenciales de acción oculares producida) dependiente de glutamato y GABA en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata, y si tales procesos de modulación podrían depender del tamaño de las motoneuronas.

En un primer grupo experimental, las motoneuronas se registraron, en preparaciones *in vitro* de rodaja, en condiciones control y durante la exposición a glutamato (5  $\mu$ M). Los resultados obtenidos mostraron que el glutamato no afectó el potencial de membrana ni la resistencia de entrada, pero produjo una disminución en la reobase y en el voltaje de despolarización. Estos cambios aumentaron con la corriente umbral de reclutamiento de las motoneuronas y dependieron de una disminución en el voltaje umbral para producir un potencial de acción. Además, el glutamato comprimió el rango de corriente de umbral de reclutamiento en las motoneuronas en comparación con la población control. En presencia de glutamato, las motoneuronas mostraron un incremento en la ganancia de la frecuencia tónica y en la frecuencia fásica de potenciales de acción. El incremento en la ganancia también se relacionó con el umbral de reclutamiento. En conclusión, el glutamato modula la frecuencia tónica y fásica de potenciales de acción de las motoneuronas mediante una disminución en el voltaje umbral de reclutamiento del potencial de acción y un aumento en la ganancia de la relación entrada-salida. Estos cambios incrementaron con el umbral de reclutamiento y con el tamaño de las motoneuronas.

Un segundo grupo experimental estudió cómo modula la concentración extracelular alta y baja de GABA la relación entrada-salida en las motoneuronas de los músculos extraoculares. Se ha descrito que a concentraciones altas de GABA se produce la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> que median la transmisión sináptica inhibitoria (denominada corriente fásica), mientras que a concentraciones bajas se activan receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos que podrían modular la excitabilidad celular (denominada corriente tónica). La adición a la cámara de registro de GABA (100  $\mu$ M) produjo una corriente mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> (~129 pA). Esta corriente disminuyó la resistencia de entrada, aumentó el umbral de reclutamiento y desplazó la relación intensidad de corriente inyectada-frecuencia de potenciales de acción generada hacia la derecha sin cambio en la ganancia. Estas modificaciones no dependieron del tamaño de la motoneurona y fueron principalmente debidas a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> de baja afinidad, es decir aquellos implicados en la transmisión sináptica rápida. A baja concentración de GABA (en ausencia de GABA exógeno añadido a la cámara de registro) y en presencia de gabazina 20  $\mu$ M (un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>) se suprimieron las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas y se observó una corriente tónica (~9 pA) en las motoneuronas. La exposición a gabazina aumentó la resistencia de entrada en función del tamaño de las motoneuronas. Como consecuencia del cambio en resistencia, disminuyó el umbral de reclutamiento de forma más pronunciada en las motoneuronas de mayor tamaño. También, la relación de intensidad de corriente inyectada-frecuencia de potenciales de acción generada se desplazó hacia la izquierda, sin cambio en la ganancia. Los efectos de la gabazina se atribuyeron, principalmente, a la corriente tónica porque su intensidad fue aproximadamente cinco veces mayor que la corriente fásica. La corriente tónica fue debida a los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad, que se localizan extrasinápticamente. Este estudio demuestra que la corriente inhibitoria tónica en las motoneuronas de los músculos extraoculares modula el umbral de reclutamiento dependiendo del tamaño de la célula.

Concluimos que el glutamato modula las propiedades activas de membrana (voltaje umbral y ganancia), mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> que generan la corriente tónica modulan las propiedades pasivas de la membrana (resistencia de entrada). Los efectos de modulación por estos neurotransmisores aumentaron con el tamaño de las motoneuronas. Estos efectos, mediados por los receptores metabotrópicos de glutamato y por los receptores GABA<sub>A</sub> que median la corriente tónica, permitirían a las motoneuronas ser reclutadas e incrementar su ganancia en la frecuencia de potenciales de acción con menores entradas excitadoras. Proponemos



que el glutamato y el GABA actúan de una manera orquestada para refinar la salida motora del sistema, permitiendo fijaciones oculares estables, en posiciones muy excéntricas de la órbita, y movimientos oculares de gran velocidad.

## 1.2. Abstract

Neurons receive and integrate synaptic signals, which can generate action potentials as a mechanism to transmit information. The neuronal input-output function can be set by changes in the recruitment threshold and in the gain. Studies in alert preparations have demonstrated that extraocular muscle motoneurons exhibit a phasic-tonic firing rate related to eye velocity and position, respectively. The slopes of these relationships are higher in motoneurons with higher recruitment thresholds and it has been proposed that this relationship depends upon synaptic inputs. On the other hand, these motoneurons receive abundant synaptic inputs mediated by glutamate and  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) neurotransmitters from different premotor sources. The present work investigates the modulation of the recruitment threshold and gain by glutamate and GABA in the rat oculomotor nucleus motoneurons, and questions if such processes could depend on motoneuron size.

In a first experimental group, motoneurons were recorded in a brain slice preparation in control conditions and during glutamate (5  $\mu$ M) application to the bath. Glutamate did not affect membrane potential or input resistance, but produced a decrease in rheobase and depolarization voltage that was dependent on recruitment threshold current. These changes were produced by a diminution in voltage threshold to evoke an action potential. In addition, glutamate compressed the range of recruitment threshold current compared to control. Motoneurons exposed to glutamate also showed an increase in the tonic frequency gain and in the peak firing frequency; such increments depended on the recruitment threshold current. In conclusion, glutamate modulates tonic and phasic discharge properties by changes in active membrane properties (action potential threshold and gain). These changes co-varied with the recruitment threshold current and motoneuron size.

A second experimental group was aimed at determining how high and low ambient GABA concentrations modulate the input-output relationship of extraocular muscle motoneurons. These two experimental conditions were carried out because phasic inhibition mediated by  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) occurs when a high concentration of GABA at the synaptic cleft activates postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors. This process allows neuronal information transfer. In addition, in some neuronal

populations, low concentrations of GABA activate non-synaptic GABA<sub>A</sub> receptors and generate a tonic inhibition, which could modulate cell excitability. Superfusion of brain slices with GABA (100  $\mu$ M) produced a sustained GABA<sub>A</sub> receptor-mediated current ( $\sim$ 129 pA) that reduced the input resistance, increased the recruitment threshold and shifted the firing frequency-current relationship rightward without any change in gain. These GABA mediated modifications did not depend on motoneuron size and were mainly due to the activation of low-affinity GABA<sub>A</sub> receptors, i.e. those involved in the fast postsynaptic events. In absence of exogenous GABA, the application of 20  $\mu$ M gabazine (an antagonist of GABA<sub>A</sub> receptors) abolished spontaneous inhibitory postsynaptic currents and revealed a tonic current ( $\sim$ 9 pA) in motoneurons. Gabazine exposure increased the input resistance as a function of motoneuron size. As a consequence of shunting, the reduction in recruitment threshold was more pronounced in larger motoneurons. Also, the firing frequency-current relationship shifted to the left, without any change in gain. Gabazine effects were chiefly due to motoneuron tonic inhibition because tonic current amplitude was five-fold greater than phasic. Tonic current were due to high-affinity GABA<sub>A</sub> receptors, which are located extrasynaptically. This study demonstrates a tonic inhibition in extraocular muscle motoneurons that modulates recruitment threshold depending on cell size.

We concluded that glutamate modulates active membrane properties (voltage threshold and gain), while tonic GABA<sub>A</sub> receptor-mediated current modulates passive membrane properties (input resistance). The effects of these neurotransmitters upon recruitment threshold and gain increased with motoneuron size. These effects mediated by metabotropic glutamate receptors and GABA<sub>A</sub> receptor mediated tonic current would allow motoneurons to be recruited and for there to be an increased firing rate gain with reduced excitatory inputs. We propose that glutamate and GABA act in an orchestrated manner to refine the motor output, allowing fixations of eye in eccentric positions in the orbit and accurate saccadic eye movement with high velocity.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2.1. Consideraciones generales.

El cerebro genera comandos motores para realizar con precisión movimientos simples o conductas complejas. Los comandos motores deben de producir la fuerza contráctil adecuada según las propiedades mecánicas de la estructura (ojos, cabeza, tronco y extremidades) que se tiene que mover. Desde esta perspectiva, el estudio de las funciones motoras cerebrales debe comenzar por comprender las características mecánicas de la estructura y su movilidad. El paso siguiente es determinar cómo se generan y refinan los comandos motores. El objetivo último de esta introducción es presentar estos elementos en relación a las fijaciones y movimientos oculares; además, se hará hincapié en los mecanismos sinápticos implicados en la transmisión de información a las motoneuronas de los músculos extraoculares y en la modulación de sus propiedades de membrana mediada por los neurotransmisores.

Entre los sistema motores, el sistema motor ocular representa el modelo donde la aplicación de algunos de los conceptos mencionados anteriormente se ha realizado con más detalle desde el comienzo de su estudio en los años 60 del siglo pasado (Robinson, 1964, 1981). Este abordaje se ha visto facilitado porque: 1. Las propiedades mecánicas del globo ocular, los músculos extraoculares, y tejidos orbitales no musculares son, en muchos aspectos, más simples que las propiedades mecánicas de los brazos y las piernas. 2. Los movimientos oculares se pueden medir con gran precisión. 3. Sólo seis músculos controlan el movimiento del ojo. 4. Los músculos oculares trabajan a carga constante. 5. Las neuronas que controlan el movimiento ocular son accesibles para su registro en preparaciones *in vivo* (Sparks, 2002; Angelaki y Hess, 2005; Spencer y Porter, 2006; Angelaki y Cullen, 2008; Kowler, 2011; Cullen, 2012). A pesar de la abundante información sobre este sistema, numerosas incógnitas continúan sin aclarar, como las destinadas a comprender los mecanismos a nivel de las propiedades de membrana de las neuronas implicadas en este sistema motor. En particular, el objetivo de este trabajo de investigación ha sido desvelar si las entradas sinápticas ejercen un efecto modulador de la excitabilidad y, por tanto, refinan los mecanismos que subyacen a la actividad de las motoneuronas.

La mayor parte de los conocimientos actuales del sistema motor ocular proceden de los estudios que se han realizado durante cinco décadas en monos, gatos y, en menor medida, en conejos. De hecho, las aportaciones de los estudios en estas especies continúan siendo de gran importancia. Sin embargo, la situación está cambiando en los últimos diez años en los que ha surgido un gran interés en la determinación de esta sistema motor en roedores (Stahl, 2004). Aunque los roedores carecen de un área en la retina con gran agudeza visual (a estas especies se les denomina “afoveadas”) presentan algunos tipos de

movimientos oculares semejantes a los descritos en gatos, monos y humanos (Stahl, 2008; de Jeu y De Zeeuw, 2012, Wallace y col., 2013). Diferentes factores han contribuido al interés creciente en el estudio de los movimientos oculares de los roedores: 1. En los últimos años se han desarrollado sistemas de alta precisión de registro de la posición y el movimiento ocular con métodos no invasivos como la video-oculografía (Stahl y col., 2000, de Jeu y De Zeeuw, 2012, Wallace y col., 2013). Estos sistemas de registro son de gran utilidad, en particular, en animales cuyo globo ocular es pequeño. 2. La generación de ratones modificados genéticamente ha irrumpido como una poderosa herramienta de investigación que puede ser muy útil también en su aplicación para el estudio del sistema motor ocular (Stahl y col., 2006; Chevallier y col., 2013; Hübner y col., 2013; Tanaka y col., 2013). 3. El fin último de la electrofisiología es determinar cómo las propiedades de las neuronas y los circuitos contribuyen a la génesis de los movimientos o conductas. El abordaje de las propiedades de membrana neuronales con procedimientos fisiológicos, farmacológicos y de biología molecular pueden ser examinadas de forma precisa en preparaciones de rodaja cerebral estudiadas *in vitro*. Los resultados de esta preparación son complementarios de los registros unitarios extracelulares realizados *in vivo* y de otros abordajes también *in vivo* (activación e inactivación neuroquímica, estimulación eléctrica...) que pretenden comprender el sistema motor ocular desde una perspectiva integrada. 4. El conjunto de estos estudios puede contribuir a comprender con mayor detalle el valor diagnóstico de los movimientos oculares en diferentes patologías (Leigh y Zee, 2006; Tilikete y Pélisson, 2008; Horn y Leigh, 2011; Kennard, 2011; Anderson y MacAskill, 2013).

## 2.2. La musculatura extraocular.

El ojo está situado en la cavidad orbitaria y está rodeado por los músculos extraoculares, tejido conectivo y grasa (figura 2.1A). Los músculos extraoculares\*, cuatro rectos (superior, inferior, medial y lateral) y dos oblicuos (superior e inferior), muestran una localización, inervación y función semejantes en las diferentes especies de mamíferos (revisado en Spencer y Porter, 2006). Los cuatro músculos rectos se originan en un anillo tendinoso (anillo de Zinn) localizado alrededor del foramen óptico. Los músculos recto medial y recto lateral se insertan en una zona de la esclerótica próxima a la córnea y, están inervados por los pares craneales III y VI, respectivamente. Estos músculos se disponen simétricamente en el meridiano horizontal del ojo y su contracción produce movimientos antagónicos de adducción y abducción del ojo. Los músculos recto superior e inferior se

---

\* Los músculos extraoculares reciben su denominación por su situación extrínseca al globo ocular. Además de los seis músculos que permiten la fijación y el movimiento ocular, los mamíferos presentan un séptimo músculo denominado elevador del párpado superior que participa, junto a los músculos orbiculares, en el parpadeo. Los animales con membrana nictitante también presentan un músculo accesorio denominado retractor bulbi, cuya contracción produce la retracción del globo ocular.

insertan sobre la línea ecuatorial del globo ocular y están inervados por el par craneal III. Su contracción produce el desplazamiento del ojo en el plano vertical, hacia arriba y hacia abajo. El músculo oblicuo superior pasa a través de un anillo fibrocartilaginoso (la tróclea) y luego se gira para insertarse en la zona superior del globo ocular. Este músculo está inervado por el par craneal IV y su contracción produce un movimiento de intorsión ocular. El músculo oblicuo inferior se origina en el hueso maxilar, luego pasa ventral al tendón del recto inferior y se inserta en la zona lateral del globo ocular próximo a la inserción del recto lateral. Su contracción produce un movimiento de extorsión del ojo.

Hallazgos recientes indican que algunos tejidos extraoculares funcionan como poleas de los músculos extraoculares (Demer y col., 2000; Khanna y Porter, 2001; Felder y col., 2005; Miller, 2007). Las poleas de los músculos extraoculares se localizan a nivel medio del globo ocular y están suspendidas del hueso de la cavidad orbitaria por un tejido fibroelástico (colágeno, elastina y músculo liso) (figura 2.1B). Las poleas son puntos de giro de los músculos extraoculares. La hipótesis de las poleas activas propone que el movimiento de la polea y del globo están coordinados aunque no necesariamente coinciden (Demer y col., 2000). El sistema de poleas activas usa las unidades motoras de los músculos extraoculares para desplazar la polea y ajustar el vector de fuerza del músculo extraocular en diferentes posiciones del ojo.

El examen histológico de los músculos extraoculares rectos y oblicuos muestra que están organizados en dos compartimentos. Cada músculo presenta una capa externa denominada orbital, adyacente al hueso de la órbita, y una capa interna denominada global próxima al globo ocular y al nervio óptico (figura 2.1C). La capa orbital está formada por fibras de pequeño tamaño en relación a la capa global. Las fibras de la capa global se extienden desde el origen hasta la inserción tendinosa en la esclerótica, mientras que las fibras orbitales terminan antes de la inserción. Las capas orbital y global se diferencian, además, en un abundante número de características morfológicas e histoquímicas que indican que la capa orbital es de contracción más lenta que la global (Spencer y Porter, 2006).

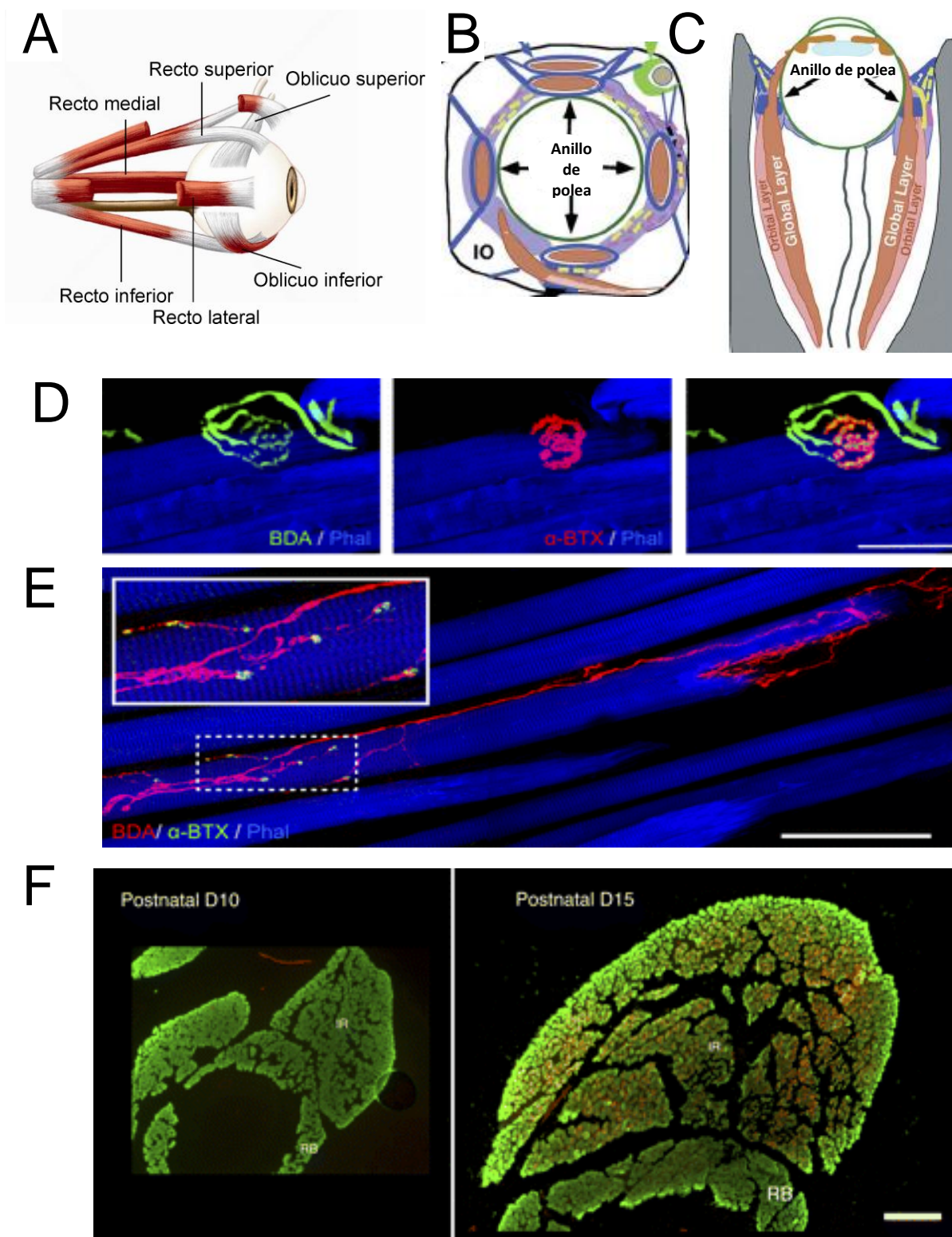
Las fibras musculares estriadas de los músculos extraoculares son las más complejas entre los músculos esqueléticos (Kono y col., 2005; Fraterman y col., 2007). Además, los músculos extraoculares reciben una inervación más abundante que otros músculos esqueléticos. Este patrón de inervación y la complejidad de sus fibras musculares hacen posible que los movimientos y fijaciones oculares sean controlados de forma muy precisa (Demer y col., 2008). Las fibras de los músculos extraoculares se han clasificado en seis

tipos (Spencer y Porter, 2006; Rashed y col., 2010; Rashed y El-Alfy, 2012). Esta clasificación está basada en la capa donde se localizan (orbital o global), la innervación que reciben (simple o múltiple), el contenido en mitocondrias (rojas, intermedias o blancas), el contenido en miofibrillas y la actividad ATPasa de la miosina. La capa orbital contiene un 80% de fibras musculares de innervación simple (SIF, “single innervated fibers”) y un 20% de fibras musculares de innervación múltiple (MIF, “multiple innervated fibers”). La capa orbital presenta 90% de fibras musculares tipo SIF y un 10% tipo MIF. Las fibras musculares SIF se caracterizan por la presencia de un solo contacto neuromuscular, mientras que las MIF muestran múltiples contactos (figura 2.1D,E). Según las características morfológicas e histoquímicas, las fibras musculares SIF de la capa orbital son fibras de contracción rápida y muy resistentes a la fatiga, mientras que las de la capa global son de contracción rápida y con resistencia alta, media y baja a la fatiga. En un estudio reciente se ha propuesto el carácter motor y no sensorial de las fibras MIF (Zimmermann y col., 2013) ya que estas fibras musculares están innervadas por neuronas situadas en los núcleos motores oculares, las uniones son colinérgicas, positivas para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y para la  $\alpha$ -bungarotoxina (marcador de receptores nicotínicos). De acuerdo a las características morfológicas e histoquímicas, las fibras musculares MIF son de contracción y fatiga muy lenta. Zimmermann y colaboradores (2013) han propuesto que la contracción de las fibras MIF puede ser necesaria para el ajuste fino de la mirada o para mantener el globo ocular en posiciones extremas.

El estudio de las isoformas de miosina y de actina durante el desarrollo postnatal en roedores ha demostrado que el periodo comprendido entre 10 y 15 días tras el nacimiento, coincidiendo con la apertura del ojo, es crucial para la maduración de los músculos extraoculares (figura 2.1F). Así, 15 días después del parto las fibras musculares han adquirido el fenotipo adulto (Zhou y col., 2010; Moncman y col., 2011, 2013). Por otro lado, durante el desarrollo postnatal la innervación múltiple de las fibras musculares es eliminada y permanece sólo una terminación; este proceso ocurre en roedores alrededor de 11 días después del parto (Fox y col., 2011).

**Figura 2.1. La musculatura extraocular.** **A**, músculos extraoculares que participan en la fijación y en los movimientos oculares. **B**, localización de los tejidos (líneas en azul) que participan en la acción de poleas musculares. **C**, localización de las capas orbital y global en los músculos extraoculares. **D**, terminación neuromuscular, con morfología de placa motora, en una fibra muscular de innervación simple (SIF). En verde se ha marcado el terminal nervioso desde el núcleo motor mediante el transporte anterógrado de BDA, en rojo los receptores nicotínicos (positivos para  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\alpha$ -BTX), en azul las fibras musculares (positivas para faloidina, Phal). Calibración: 100  $\mu$ M. **E**, Terminaciones neuromusculares, con morfología de contactos motores en racimo, en una fibra muscular de innervación múltiple (MIF). En este caso los terminales nerviosos contra los receptores nicotínicos se observan en rojo y en verde el revelado y en azul se marca las fibras musculares. Barra de calibración: 100  $\mu$ m. **F**, Distribución de diferentes isoformas de miosina en la sarcómera (verde) y del fenotipo adulto de la cadena pesada de miosina (rojo). Obsérvese que 10 días después del parto el marcaje inmunohistoquímico del fenotipo de miosina adulto fue negativo mientras que se observó en todas las fibras 15 días después del parto. IR, recto inferior; RB, retractor bulbi. Barra de calibración: 500  $\mu$ m. Imágenes tomadas de Glimcher, 2003 (A); Spencer y Porter, 2006 (B,C); Zimmermann y col., 2013 (D,E); Moncman y col., 2011 (F).





### 2.3. Los movimientos oculares.

El mantenimiento estable de las imágenes sobre la retina es necesario para la percepción visual. Con este fin, los movimientos oculares se dividen en dos tipos principales: movimientos compensatorios del ojo cuando se desplaza la cabeza y/o el campo visual completo; movimientos que desplazan la retina con respecto al entorno para buscar nuevos blancos visuales o para seguirlos, y movimientos que permiten la visión binocular. Estos últimos movimientos incluyen:

- **Los movimientos oculares sacádicos** son movimientos rápidos de los ojos que desplazan la dirección de la línea de visión de un punto a otro. La velocidad de estos movimientos alcanza hasta los 800°/segundo. En primates, los movimientos oculares sacádicos conjugados se realizan para localizar un blanco en el entorno y luego los ojos se fijan en la dirección del objeto. Se desconoce en detalle qué características del estímulo ponen en marcha estos movimientos. Sin embargo, las propiedades de disparo de las neuronas premotoras y motoras son muy conocidas. El sistema motor sacádico genera dos funciones, por un lado, produce un pulso de fuerza que vence la resistencia viscoelástica del globo ocular y mueve el ojo a gran velocidad. La señal de pulso disminuye gradualmente hasta una señal tónica (step signal) que compensa las propiedades elásticas del tejido. Por lo tanto, las motoneuronas producen una señal de pulso (o brote de potenciales de acción) seguida por una caída gradual de la actividad (slide signal) y una frecuencia tónica (step signal) relacionada con la nueva posición ocular (revisado en Scudder y col., 2002; Sparks, 2002).

- **Los movimientos oculares de vergencia** son movimientos oculares lentos que desplazan a los ojos para mantener en la línea de visión a un estímulo, evitando la visión doble, y permitiendo la visión en profundidad. Estos movimientos se dividen en convergentes y divergentes. Este tipo de movimiento sólo activan los rectos medial y lateral. Dependiendo de la distancia del objeto de interés, los ojos se aproximarán (convergencia) cuando el blanco esté cerca, o se separarán (divergencia) cuando esté lejos. Los movimientos de vergencia son generalmente pequeños (menos de 5 grados) y lentos.

- **Los movimientos de seguimiento** son movimientos lentos de los ojos que permiten mantener la visión de un objeto mientras se desplaza en el campo visual. La realización de estos movimientos requiere de un sistema especializado pero utiliza, en parte, los circuitos de los reflejos optocinético y vestíbulo-ocular. Además, los movimientos oculares de seguimiento no se registran en animales sin fovea.

Los tres tipos de movimientos mencionados en los párrafos anteriores han sido ampliamente documentados en mamíferos con una fovea desarrollada (Glimcher, 2003; Hayhoe y Ballard, 2005; Orban de Xivry y Lefèvre, 2007; Cullen y Van Horn, 2011; Kowler, 2011; Schütz y col., 2011). Los movimientos oculares en primates están coordinados de una manera muy precisa para mantener fijo el blanco visual. Mantener en línea de visión al objeto de interés (activando los receptores de la fovea) es crítico para la visión binocular. La falta de alineamiento produce visión doble.

Los estudios de los movimientos oculares sacádicos en mamíferos afoveados como los roedores son más limitados y su importancia funcional se apoya en conjeturas (Fuller, 1985; Chelazzi y col., 1989; Wallace y col., 2013). Los movimientos oculares sacádicos se han medido en la rata con la cabeza inmóvil y en el animal libre de movimientos. Cuando se fija la cabeza, las ratas realizan movimientos conjugados de una amplitud media de ~14 grados, los movimientos son infrecuentes 5-20/minuto, en el periodo entre movimientos el animal fija la posición ocular (figura 2.2A,B). En situación de animal libre, la dinámica de los movimientos oculares es compleja, no suelen ser conjugados y son asimétricos (figura 2.2C,D). Además sus ojos se mueven continuamente, siendo incapaces de mantener fija la posición ocular de ambos ojos en un objeto mientras se mueven (Wallace y col., 2013). La situación lateral de los ojos en la cabeza, la escasa agudeza visual – falta de fovea en la retina, y la ausencia de capacidad para la acomodación del cristalino (Euler y Wässle, 1995; Douglas y col., 2005) sugiere que la función ocular está destinada a ofrecer una visión panorámica. No obstante, los roedores no son completamente incapaces de tener visión binocular, percepción estereoscópica o visión detallada, ya que pueden utilizar el sistema visual para la visión en profundidad (Legg y Lambert, 1990; Zoccolan y col., 2009).

Los mecanismos de estabilización de la mirada se dividen en dos tipos: **el reflejo vestibulo-ocular y el reflejo optocinético** (Stahl, 2008; figura 2.1E-H). Estos movimientos oculares reflejos se encuentran en animales foveados y afoveados. El sistema vestibulo-ocular depende de los canales semicirculares que determinan con precisión la aceleración con la que se rota la cabeza en cualquier dirección. El sistema optocinético depende de los fotorreceptores para computar la velocidad y dirección a la cual se desplaza el campo visual a través de la retina. Estos sistemas sensoriales ponen en marcha el movimiento del ojo, mediante los músculos extraoculares, para producir su desplazamiento y permitir que la línea de visión se mantenga fija en relación al medio que rodea al animal. Ambos reflejos incluyen una fase de movimiento ocular lento compensatorio, con desplazamiento opuesto al movimiento de la cabeza en el caso de la activación del sistema vestibular y con desplazamiento en el mismo sentido del estímulo en el caso del reflejo optocinético, y otro

rápido, de tipo sacádico, anticompensatorio que recentra al ojo en la órbita. Al conjunto de estos dos movimientos se les denomina nistagmo vestibular y optocinético (figura 2.2E,F). El sistema vestibulo-ocular es más eficiente a altas velocidades de rotación. Así para la rotación sinusoidal de la cabeza de 1Hz o superior la ganancia (amplitud del movimiento del ojo / amplitud del movimiento de la cabeza) del reflejo es próxima a 1 y la fase tiende a cero (figura 2.2G,H). El sistema optocinético funciona mejor a bajas velocidades de rotación del campo visual (figura 2.2I; Faulstich y col., 2006). Actuando de forma conjunta ambos sistemas motores tienen la capacidad de estabilizar las imágenes en la retina.

## 2.4. Las motoneuronas de los músculos extraoculares.

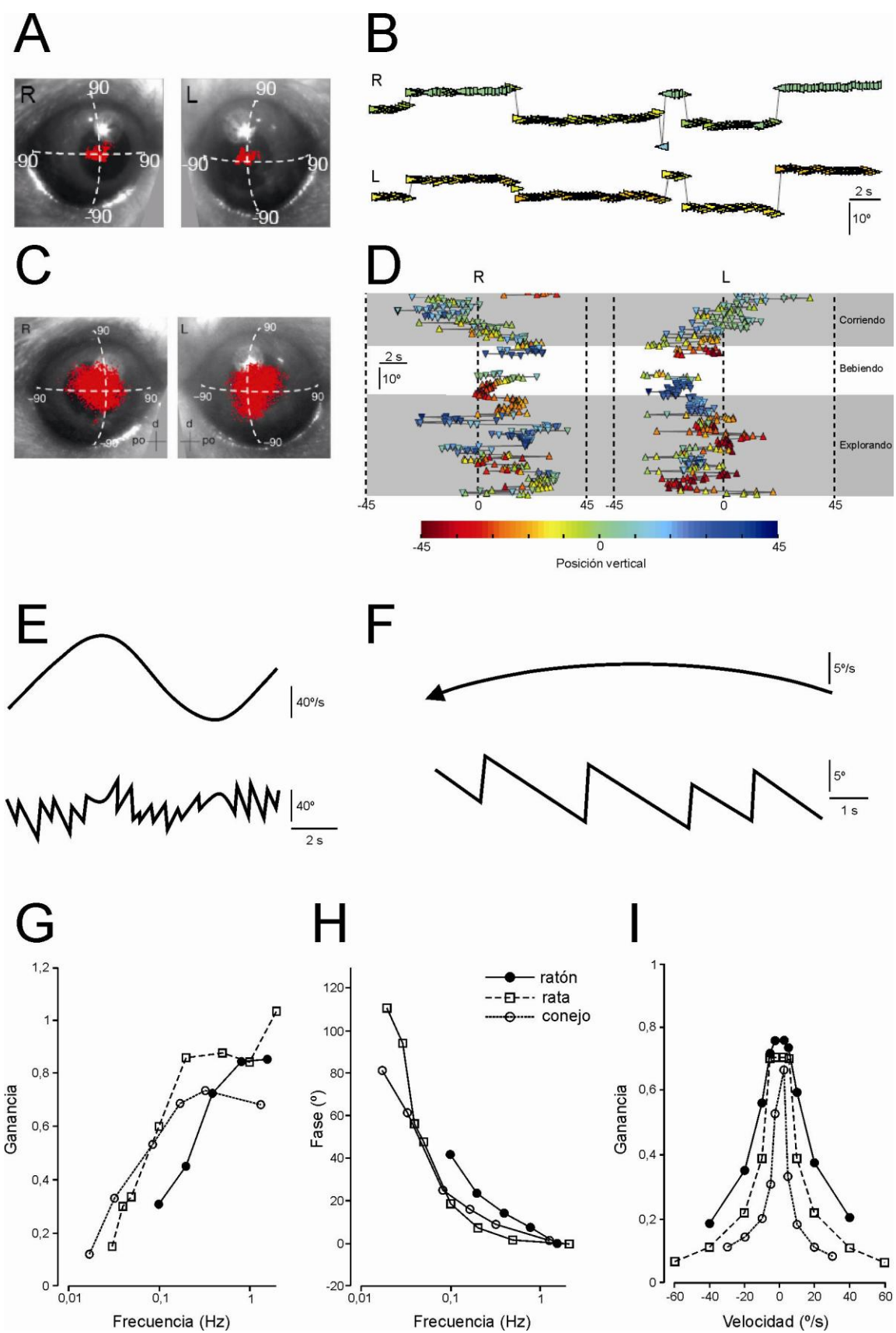
### 2.4.1. Morfología.

Los músculos extraoculares están inervados por los pares craneales III o nervio oculomotor, IV o troclear, y VI o nervio motor ocular externo. Estos pares craneales tienen su origen en los núcleos motores oculares: motor ocular común, troclear y motor ocular externo localizados en el tronco del encéfalo (figura 2.3A). El núcleo motor ocular común se localiza en el mesencéfalo, a nivel del tubérculo cuadrigémino superior. Las motoneuronas de este núcleo forman grupos relativamente separados que codifican el movimiento de los músculos recto medial, recto inferior, oblicuo inferior homolateral y recto superior contralateral. El núcleo troclear, se localiza en el mesencéfalo caudal con respecto al núcleo motor ocular común, contiene las motoneuronas que forman el nervio troclear e inervan al músculo oblicuo superior contralateral. El núcleo motor ocular externo se localiza en la protuberancia próximo al IV ventrículo, contiene las motoneuronas que forman el nervio motor ocular externo e inervan al músculo recto lateral homolateral.

Las motoneuronas de estos núcleos muestran un soma poligonal y entre 4-8 dendritas principales que se extienden en todas las direcciones del núcleo (figura 2.3B,C). Estudios de las motoneuronas aferentes a las fibras musculares de inervación simple y múltiple muestran diferencias en su localización, morfología y fenotipo inmunohistoquímico (Büttner-Ennever y col., 2001; Eberhorn y col., 2005 y 2006; Horn y col., 2008; Ying y col., 2008). Las

---

**Figura 2.2. Movimientos oculares en la rata.** A,B, movimientos sacádicos y fijaciones de los ojos derecho (R) e izquierdo (L) en una rata inmovilizada. En A se representan con puntos rojos la posición de las pupilas (~1000 puntos). En B se representa la cinética de la posición ocular para una fracción de tiempo del registro total. C,D, movimientos oculares en una rata libre de movimientos. En C se ha realizado una representación similar a A (en este caso se ilustran ~5000 puntos), en D se representa el movimiento ocular en el plano horizontal y vertical (según código de colores). E, reflejo vestibulo-ocular. F, reflejo optocinético. G, ganancia del reflejo vestibulo-ocular a diferentes velocidades de rotación de la cabeza. Los datos se muestran para diferentes especies afoveadas. Los datos se obtuvieron para el reflejo realizado en condiciones de oscuridad. H, modificación de la fase del reflejo vestibulo-ocular según la velocidad de rotación de la cabeza. I, modificación de la ganancia del reflejo optocinético producida a diferentes velocidades de rotación del campo visual. Imágenes tomadas de Wallace y col., 2013 (A-B), Fuller, 1985 (E), Hess y col., 1988 (F) y de Stahl, 2008 (G-I).



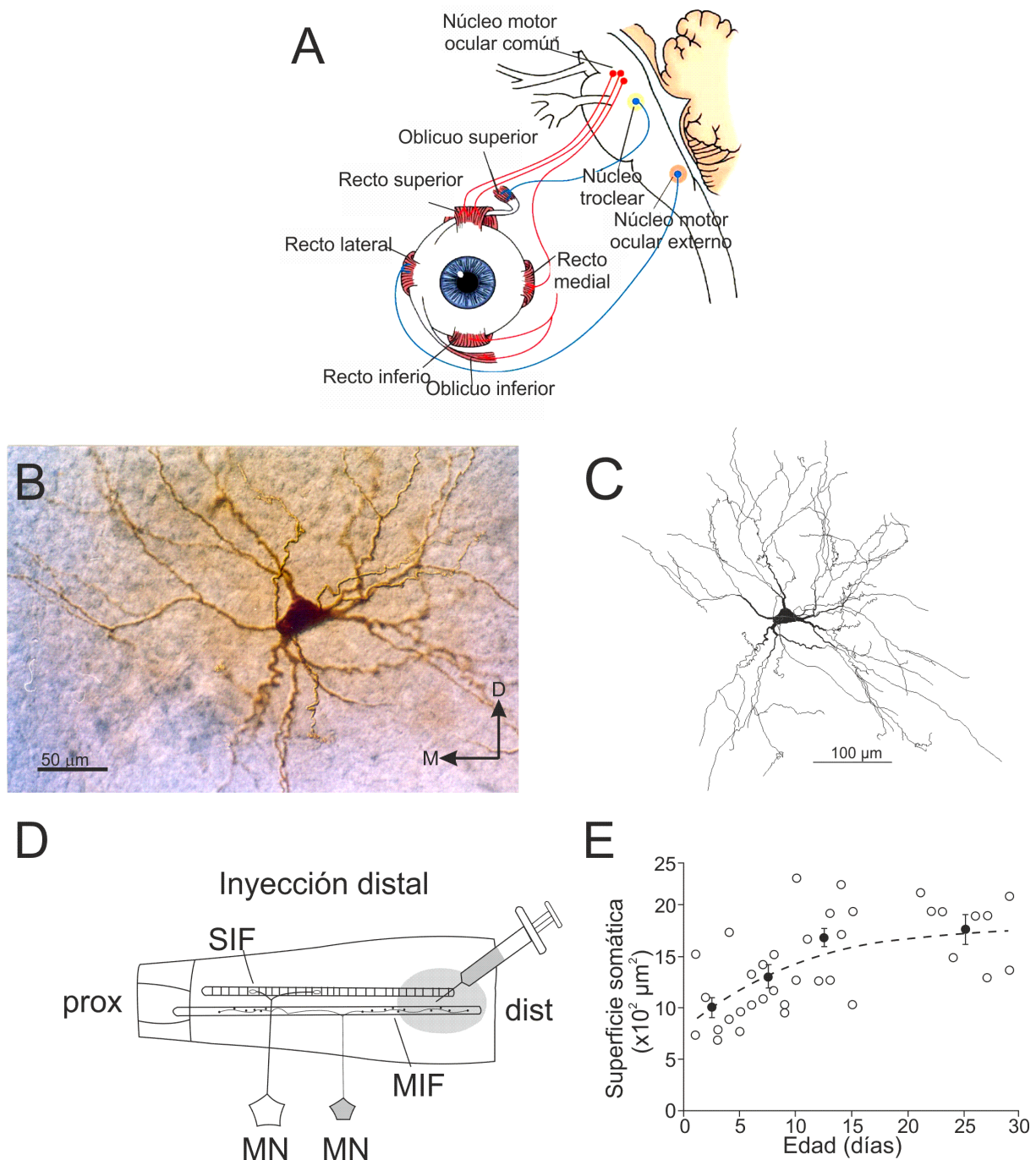
motoneuronas MIF y SIF se han identificado por marcaje retrógado. Para identificar a las motoneuronas aferentes a las fibras musculares de innervación simple y múltiple el trazador se inyectó en la porción central y distal del músculo, respectivamente (figura 2.3D). Los resultados obtenidos muestran que estas dos poblaciones de motoneuronas tienden a estar separadas tanto en monos como en ratas. Además, las motoneuronas que proyectan a las fibras musculares de innervación múltiple se diferencian en términos anatómicos de las que proyectan a las fibras musculares de innervación simple por ser más pequeñas y porque sus dendritas se extienden fuera de los límites anatómicos del núcleo donde se localizan. La inmunohistoquímica también reveló diferencias, así las motoneuronas que proyectan a las fibras de innervación simple son positivas para el marcador de redes perineuronales y para los neurofilamentos no fosforilados, mientras que las motoneuronas que proyectan a las fibras de innervación múltiple fueron negativas para estos marcadores.

Por otro lado, se ha estudiado los cambios en morfometría de las motoneuronas de los músculos extraoculares durante la maduración postnatal en ratas (Carrascal y col., 2009), y se han distinguido dos etapas. La primera etapa se extiende desde el nacimiento hasta 10 días después del parto. En este periodo, se ha encontrado un incremento progresivo en la complejidad dendrítica y en el área somato-dendrítica. Durante la segunda fase, entre 10 y 30 días después del parto, las dendritas se alargan mientras que el árbol dendrítico se simplifica. En esta segunda fase el crecimiento de la superficie del soma y las dendritas fue pequeño, de tal modo que las ratas con dos semanas de edad muestran un tamaño semejante a las adultas (figura 2.3E).

#### **2.4.2. Fisiología de las motoneuronas en preparaciones alerta.**

- **Las motoneuronas y el mantenimiento de la posición.** La frecuencia de disparo de las motoneuronas oculares ha sido estudiada en diversas especies de vertebrados, incluyendo a especies sin fovea como el ratón (Robinson, 1970; Delgado-García y col., 1986; Goldstein y Robinson, 1986; Fuchs y col., 1988; Stahl y Simpson, 1995; Sylvestre y Cullen, 1999; Pastor y Gonzalez-Forero, 2003; Davis-López de Carrizosa y col., 2011; Stahl y Thumser, 2012). Las motoneuronas muestran un patrón de disparo tónico-fásico, similar en términos cualitativos en todas las especies estudiadas, relacionado con la posición y la velocidad ocular (figura 2.4A,B). Durante las fijaciones oculares el músculo realiza una tensión sostenida que incrementa exponencialmente con la excentricidad del ojo en la órbita (Davis-López de Carrizosa y col., 2011). Cada motoneurona comienza a disparar potenciales de acción a una frecuencia relativamente constante cuando el ojo alcanza una posición determinada en la órbita. La frecuencia de disparo incrementa linealmente con





**Figura 2.3. Morfología de las motoneuronas oculares.** **A**, localización de las motoneuronas oculares en el tronco del encéfalo. **B**, fotomicrografía de una motoneurona del núcleo motor ocular común con sus dendritas expandiéndose en diferentes direcciones. Barra de calibración: 50  $\mu\text{m}$ . **C**, reconstrucción de la motoneurona mostrada en B. Barra de calibración: 100  $\mu\text{m}$ . D y M en B indican dorsal y medial en una sección coronal de tejido. **D**, marcaje mediante trazado retrógrado de las motoneuronas que innervan a las fibras musculares de innervación múltiple. **E**, incremento en la superficie de membrana del soma durante el desarrollo postnatal. Imágenes tomadas de Siegel y Sapru, 2010 (A), Carrascal y col., 2009 (B,C y E), Eberhon y col., 2006 (D).

posiciones oculares más excéntricas relativas al umbral (figura 2.4C). La pendiente de esta relación (denominada  $k$ ) indica la sensibilidad a la posición ocular de cada motoneurona. El umbral de reclutamiento y  $k$  es diferente entre las motoneuronas oculares y se distribuyen en un amplio rango. Estas diferencias en umbral y sensibilidad aseguran una fina graduación de la fuerza a realizar para mantener la posición ocular. Además, cuanto más alto es el umbral de reclutamiento mayor es  $k$ .

- **Las motoneuronas y el movimiento.** Las motoneuronas oculares también muestran un brote de potenciales de acción (componente fásico) que covaría con la velocidad del movimiento ocular sacádico (Delgado-García y col., 1986; Gómez y col., 1986). La pendiente de esta relación se denomina  $r$  e indica la sensibilidad a la velocidad ocular de cada motoneurona. Esta sensibilidad también incrementa con el umbral de reclutamiento. Una vez concluido el movimiento sacádico se produce una disminución en la frecuencia de potenciales de acción de la motoneurona hasta alcanzar un frecuencia tónica que se relaciona estrechamente con la caída de tensión del músculo en este periodo hasta alcanzar un tono muscular estable que permite la fijación ocular en la órbita (Davis-López de Carrizosa y col., 2011).

El origen de la sensibilidad a la posición ocular en las motoneuronas de los músculos extraoculares aún no ha sido completamente aclarado. Dean y colaboradores (Dean, 1997; Hazel y col., 2002) realizando estudios de simulación neuronal han propuesto tres principales posibilidades: 1. Cada neurona recibe idénticas entradas sinápticas. Las diferencias que resultan en la sensibilidad dependen de las propiedades intrínsecas de membrana. 2. Las diferencias en la frecuencia de potenciales de acción de las motoneuronas están determinadas exclusivamente por las diferencias en sus entradas sinápticas. 3. Tanto las propiedades intrínsecas de membrana como las entradas sinápticas contribuyen a las diferencias en la sensibilidad a la posición ocular de cada motoneurona. *Esta hipótesis será evaluada en este trabajo* mediante preparaciones de rodaja de cerebro. Se registrarán las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata y se añadirán a la cámara de registro agonistas y antagonistas de los receptores para los neurotransmisores glutamato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

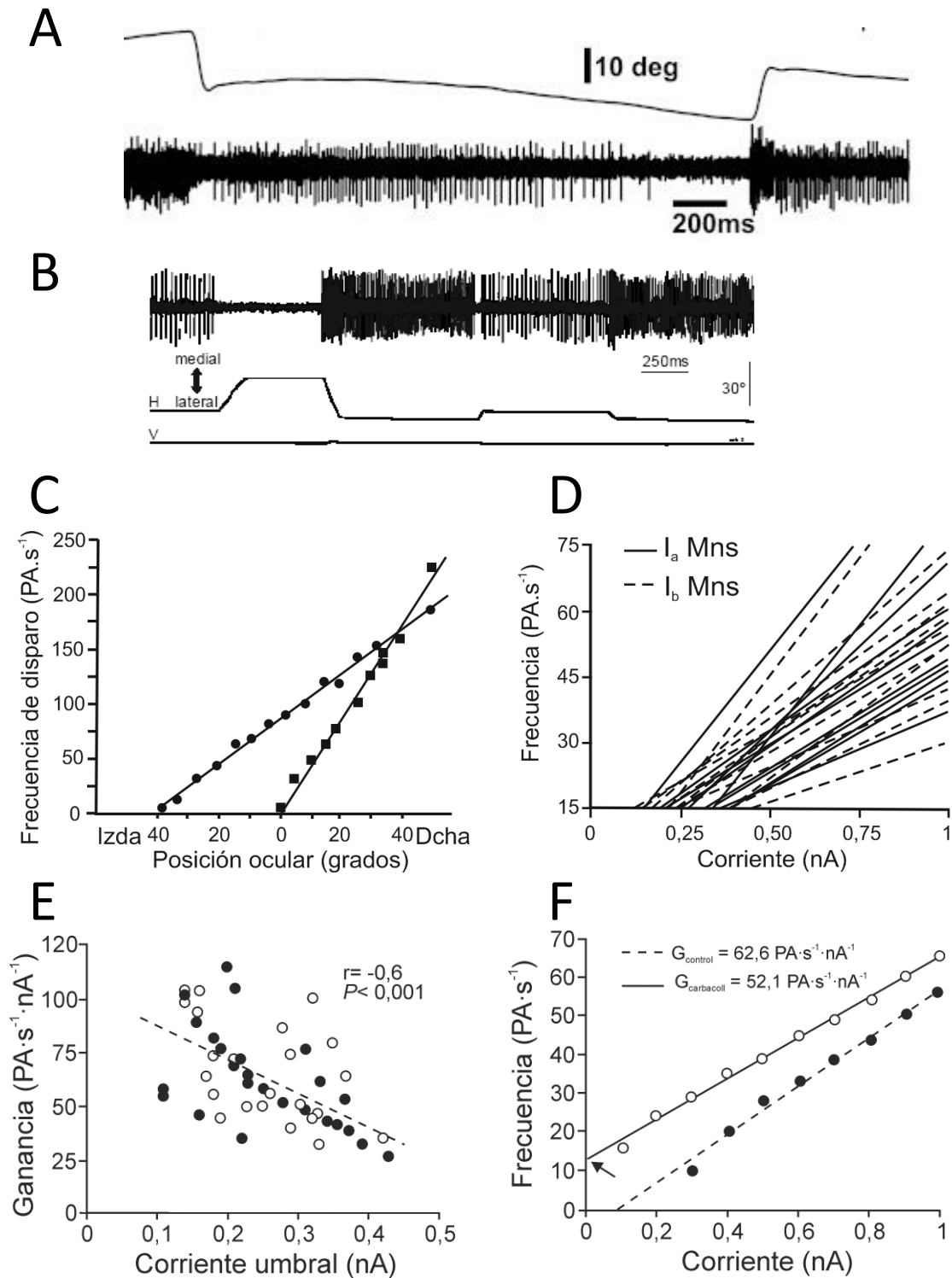
### 2.4.3. Fisiología de las motoneuronas en preparaciones in vitro.

- **Propiedades de membrana, umbral de reclutamiento y sensibilidad en el disparo tónico.** Usando preparaciones “in vitro”, se ha demostrado recientemente que las motoneuronas del núcleo motor ocular común muestran una actividad fásico-tónica, en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes, que se asemeja a aquella que muestran las



motoneuronas en preparaciones *in vivo* (Nieto-González y col., 2007). Además, la frecuencia tónica de potenciales de acción incrementa linealmente con la intensidad de corriente inyectada (figura 2.4D). En estas condiciones experimentales, se ha encontrado una relación inversa entre el umbral de reclutamiento y la pendiente (ganancia) en las relaciones *I-F* (figura 2.4E). *De acuerdo a estos hallazgos se ha descartado a las propiedades intrínsecas de membrana como el mecanismo que soporta la covariación entre el umbral de reclutamiento y la sensibilidad a la posición ocular descrito en preparaciones “in vivo” (Nieto-González y col., 2007).* Esta sugerencia está, además, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante perfusión con carbacol (10  $\mu$ M, agonista de los receptores colinérgicos) de rodajas de tejido que contienen el núcleo motor ocular común y registrando la actividad de las motoneuronas en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes. Así, la perfusión con carbacol produce una disminución en la relación lineal de las curvas *I-F* que acompaña al decremento en el umbral de reclutamiento (figura 1.4E; Nieto-González y col., 2009). Por último, el bloqueo de las entradas sinápticas inhibitoras o excitadoras-inhibidoras modifica significativamente la frecuencia de disparo en las motoneuronas del núcleo motor ocular externo (Pastor y González-Forero, 2003). *En conjunto, todos estos resultados sugieren que el umbral de reclutamiento y la frecuencia de disparo son moduladas, en gran medida, por las entradas sinápticas. Como se ha señalado anteriormente, progresar en el estudio de esta hipótesis constituye el núcleo fundamental de estudio de esta Tesis Doctoral.*

• **Maduración postnatal de las propiedades de membrana.** En preparaciones *in vitro* se ha estudiado la maduración postnatal de las propiedades pasivas y activas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata (Carrascal y col., 2005, 2006). Se ha encontrado que las propiedades pasivas de membrana (resistencia de entrada y constante de tiempo) maduran muy rápidamente tras el nacimiento. Alrededor de 1 semana después del parto alcanzan valores semejantes a las motoneuronas adultas. Las propiedades activas (reobase, duración del potencial de acción, duración de la fase de posthiperpolarización que sigue al potencial de acción, relación entre la corriente inyectada y la frecuencia de potenciales de acción) maduran más tarde y alrededor de dos semanas después del nacimiento muestran valores próximos a los encontrados en motoneuronas adultas. Además, se ha encontrado que el incremento en la excitabilidad neuronal durante el desarrollo postnatal depende, en gran medida, de modificaciones en el voltaje umbral y no depende de los cambios en el tamaño de las motoneuronas (Carrascal y col., 2011).



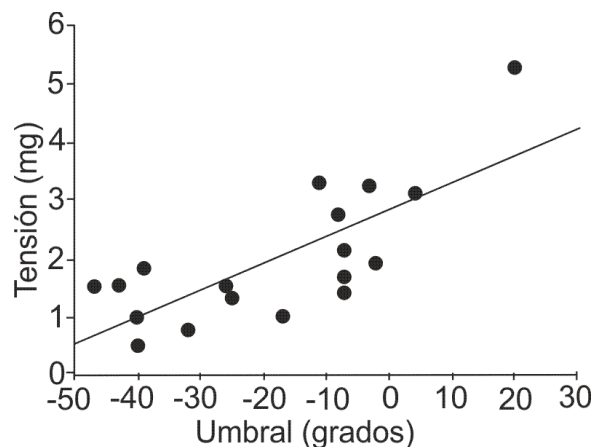
**Figura. 2.4. Fisiología de las motoneuronas oculares.** A, B, registro extracelular de una motoneurona del núcleo motor ocular externo durante la realización del reflejo vestibulo-ocular en el ratón (A) y durante movimientos sacádicos y fijaciones oculares en el mono (B). C, relación entre la frecuencia de disparo y la posición ocular en dos motoneuronas representativas. D, relación de la frecuencia de disparo con la intensidad de corriente inyectada (curvas *I-F*) en las motoneuronas del núcleo motor ocular común estudiadas en preparaciones *in vitro*. E, relación inversa entre la ganancia (pendiente de la relación *I-F*) y el umbral de reclutamiento. F, efecto del carbacol (agonista colinérgico) sobre el umbral y la pendiente de la relación *I-F* en una motoneurona representativa del núcleo motor ocular común. Imágenes tomadas de Stahl y Thumser, 2012 (A), Fuchs y col., 1985 (B), Sparks, 2002 (C), Nieto-González y col., 2007(D,E), y Nieto-González y col., 2009 (F).

## 2.5. El principio del tamaño en motoneuronas.

Las motoneuronas, cuyos axones se ramifican para inervar a las fibras musculares, controlan la contracción muscular. Del acortamiento-tensión que realiza el músculo esquelético derivan los cambios en posición (movimiento) o la fijación de cualquier articulación móvil o del propio ojo. Cada fibra muscular recibe la información de una motoneurona, pero cada motoneurona puede inervar sólo unas pocas o cientos de fibras musculares. Al conjunto de una motoneurona y las fibras musculares a las que inervan se denomina unidad motora. Cada potencial de acción producido por una motoneurona  $\alpha$  y sus fibras asociadas constituyen la unidad de fuerza más pequeña que puede ser activada para producir movimiento. Las unidades motoras actúan conjuntamente para producir la contracción muscular. El tamaño de las unidades motoras cambia en los diferentes tipos de músculos: una unidad motora en el sóleo tiene una innervación  $\sim 180$  fibras musculares por motoneurona; en el gastrocnemio tiene una innervación  $\sim 1000$ - $2000$  fibras musculares por motoneurona; las unidades motoras en los músculos extraoculares es muy pequeña tiene una innervación de 3-10 fibras musculares por motoneurona. Además, una alta proporción de las fibras musculares son de contracción rápida. Debido al tamaño de la unidad motora y la velocidad de contracción de las fibras musculares, los movimientos sacádicos son rápidos y precisos (Barmack, 1977; Stålberg y col., 1996). Como cada músculo es controlado por una población de motoneuronas, la fuerza puede ser modificada por cambios en el número de unidades motoras reclutadas y por cambios en la frecuencia de potenciales de acción de cada motoneurona (Kernell y col., 1999).

Las características contráctiles de las unidades motoras en los músculos extraoculares han sido estudiadas en diversas especies de mamíferos (Barmack, 1977; Shall y Golberg, 1992; Goldberg y col., 1998; Shall y col., 2003; Gamlin y Miller, 2012). Estos estudios han clasificado las unidades motoras según la velocidad de contracción y fatiga; la frecuencia de disparo y la fuerza desarrollada; la relación entre el tren de estímulos y la tensión alcanzada. En un estudio reciente (Gamlin y Miller, 2012) realizado en el mono se ha encontrado que la tensión que desarrolla el músculo extraocular como consecuencia de cada activación de una unidad varía entre 0,5-5 mg, su retraso es  $\sim 2,4$  ms, el tiempo al pico de contracción es de  $\sim 9$  ms. Las motoneuronas se reclutan en orden (de menor a mayor) según la tensión que realizan. Es decir, como en otros músculos esqueléticos, se reclutan siguiendo el “principio del tamaño”.

Según el principio del tamaño (Henneman y col., 1965; Mendell, 2005), las unidades motoras se reclutan de forma ordenada. Primero se activan las unidades motoras de menor umbral, que corresponden a las motoneuronas más pequeñas, que presentan axones de menor diámetro e inervan fibras musculares con menor vigor en la contracción, y una velocidad de contracción y fatiga más lenta. A continuación se van activando unidades motoras con umbrales de reclutamiento y tamaño cada vez mayor. El incremento del umbral covaría con el incremento en la tensión que realiza la unidad motora, la velocidad de contracción y fatiga (figura 2.5). La inhibición sináptica sigue un patrón inverso, siendo las motoneuronas de mayor tamaño las primeras en inhibirse. El principio del tamaño se basa en que las motoneuronas de menor superficie tienen mayor resistencia y, según la ley de Ohm, producen un cambio mayor en voltaje ante una misma entrada de corriente sináptica despolarizante al ser comparadas con las motoneuronas de mayor superficie. Esto permite a las motoneuronas pequeñas alcanzar el umbral de reclutamiento con intensidades menores de corriente. *En este marco de conocimientos, este trabajo investigará: si la relación entre tamaño y umbral de reclutamiento se cumple en las motoneuronas oculares, y si el glutamato - GABA podrían ejercer sus efectos en función del tamaño-umbral de reclutamiento de las motoneuronas.*



**Figura 2.5. Relación entre la tensión de la unidad motora y el umbral de reclutamiento.** Imagen tomada de Gamlin y Miller, 2012.

## 2.6. El sistema premotor ocular.

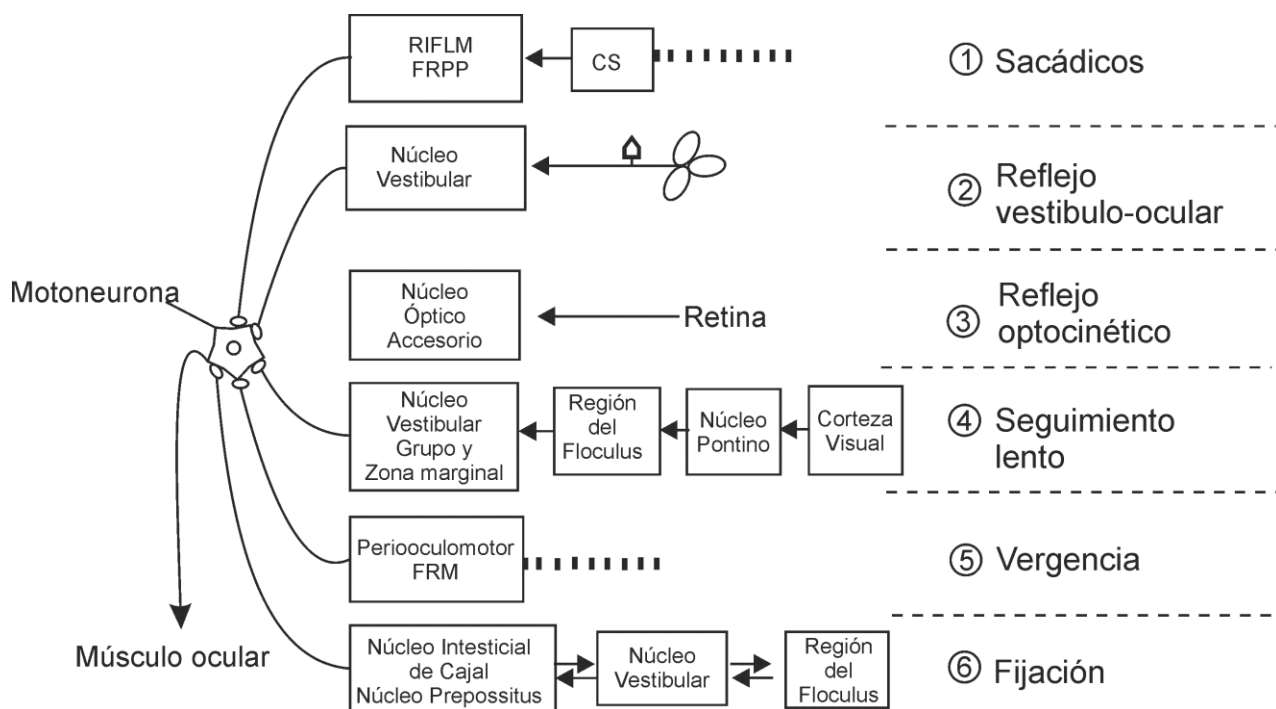
El ojo está siempre en dos situaciones, desde un punto de vista mecánico, cambiando de posición o inmóvil. El movimiento y la fijación ocular dependen de la musculatura extraocular y, por lo tanto, de la actividad de las motoneuronas que lo inervan. Los diferentes tipos de movimientos oculares se producen por circuitos relativamente independientes del sistema nervioso central en respuesta, la mayor parte de las veces, a estímulos activadores de la vía visual o del aparato vestibular. A pesar de la diversidad de estructuras que participan en la generación de los movimientos oculares, todas las órdenes motoras convergen en un restringido número de centros premotores del tronco del encéfalo (figura 2.6). En estas regiones se localizan las neuronas que proyectan de forma monosináptica sobre las motoneuronas oculares. Los núcleos y neuronas que proyectan a los núcleos motor ocular común y troclear se han relacionado con el sistema premotor que genera los movimientos verticales y, en parte, horizontales; los núcleos y neuronas que proyectan al núcleo motor ocular externo se han relacionado con el sistema premotor que generan los movimientos en el plano horizontal. Los núcleos implicados en los movimientos oculares en el plano vertical y horizontal son diferentes y con frecuencia se presentan de forma separada. Sin embargo, no se puede olvidar que los seis músculos extraoculares participan en todos los tipos de movimientos, los estudios con trazadores transsinápticos revelan las conexiones directas entre los sistemas premotores que actúan en ambos planos, y que se asume que las señales que aportan los sistemas del generador horizontal y vertical a las motoneuronas es similar pero en diferentes planos (Graf y col., 2002; Sparks, 2002; Büttner-Ennever, 2006).

### 2.6.1. Aferencias a los núcleos motores oculares.

Las aferencias a los núcleos motores oculares han sido estudiadas en diversas especies de vertebrados (revisado en Evinger, 1988; Büttner-Ennever, 2006; Highstein y Holstein, 2006; Horn, 2006; Horn y Leigh, 2011).

- **Núcleos vestibulares.** Las proyecciones desde los núcleos vestibulares a los núcleos motores oculares se conocen desde hace casi un siglo. Primero se examinaron con técnicas de degeneración retrógrada y, luego, mediante trazadores de transporte retrógrado (Büttner-Ennever, 2006; Highstein y Holstein, 2006). Los estudios de estimulación del sistema vestibular e identificación de los efectos postsinápticos en las motoneuronas han permitido establecer los circuitos que hacen posible el reflejo vestibulo-ocular. La estimulación eléctrica del canal semicircular posterior excita disinápticamente a las motoneuronas contralaterales que inervan a los músculos oblicuos superior y recto inferior; además, inhibe disinápticamente a las motoneuronas homolaterales que inervan a los

músculos recto superior y oblicuo inferior. La estimulación del canal semicircular anterior excita disinápticamente a las motoneuronas contralaterales que inervan a los músculos recto superior y oblicuo inferior; además, inhibe disinápticamente a las motoneuronas del lado homolateral que inervan al oblicuo superior y recto inferior. La estimulación del canal semicircular horizontal excita disinápticamente a las motoneuronas contralaterales del recto lateral y a las homolaterales del recto medial; además, inhibe a las motoneuronas del recto lateral homolateral. Estas conexiones hacen posible el reflejo vestibulo-ocular en los planos horizontal y vertical (Highstein y Holstein, 2006). Por otro lado, las señales que generan el reflejo optocinético y los movimientos de seguimientos alcanzan, en parte, a las motoneuronas desde los núcleos vestibulares (Partsalis y col., 1995; Thier y Ilg, 2005; Frens y Donchin, 2009).



**Figura 2.6. Aferencias sinápticas a las motoneuronas extraoculares y movimientos oculares asociados.** Varios circuitos neuronales relativamente independientes convergen a nivel de las motoneuronas para generar los movimientos oculares. Este esquema simplificado ilustra las estructuras implicadas en cinco tipos de movimientos oculares y en el mantenimiento de la posición ocular. CS, colículo superior; FRM, formación reticular del mesencéfalo; FRPP, formación reticular pontina paramediana; RIFLM, núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial. Imagen tomada de Horn y Adamczyk, 2012.

• **El núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial.** Las neuronas de este núcleo proyectan a los núcleos motor ocular común y troclear (Büttner-Ennever y Büttner, 1978; Büttner-Ennever y col., 1982; Moschovakis, 1991a,b; Horn y Büttner-Ennever, 1998; Horn, 2006). El núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial incluye, al menos, tres tipos funcionales de neuronas: 1. Neuronas de brote excitador, cuya actividad está relacionada con movimientos hacia arriba del ojo y sus terminaciones neuronales alcanzan a las motoneuronas del oblicuo inferior y del recto superior. 2. Neuronas de brote inhibidor que están activas con movimientos hacia arriba del ojo y sus terminaciones axónicas alcanzan a las motoneuronas de los músculos recto inferior y oblicuo superior; estas neuronas pueden producir la inhibición de las poblaciones de motoneuronas a las que proyecta para permitir movimientos oculares hacia arriba. 3. Neuronas de brote hacia abajo, las cuales se activan con movimientos oculares hacia abajo y sus terminaciones alcanzan a las motoneuronas del recto inferior y oblicuo superior. Las proyecciones de este núcleo hacia al núcleo motor ocular común son principalmente homolaterales (Moschovakis y col., 1996).

• **El núcleo intersticial de Cajal.** Este núcleo se localiza lateral y caudal al núcleo rostral del fascículo longitudinal medial y su función se ha asociado al mantenimiento de la posición ocular en el plano vertical (Fukushima y col., 1992). El núcleo intersticial de Cajal proyecta principalmente de forma homolateral al núcleo motor ocular común y troclear.

• **Formación reticular pontina paramediana y bulbar.** El término “formación reticular paramediana del puente” se describió en monos para definir la zona del tronco cerebral cuya lesión producía parálisis motora en los ojos (Cohen y Komatsuzaki, 1972). Esta región incluye a los núcleos reticulares de puente rostral y caudal, así como a la línea media. El núcleo reticular del puente rostral contiene a las neuronas de brote excitador relacionadas con el movimiento horizontal (Moschovakis y col., 1996). Las neuronas de brote están agrupadas bajo el fascículo longitudinal medial y se sitúan rostrales al núcleo motor ocular externo. Las neuronas de brote proyectan monosinápticamente sobre las motoneuronas y neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo del lado homolateral. Por otro lado, las neuronas de brote inhibidor se localizan caudales en relación a las excitadoras y proyectan a las neuronas del núcleo motor ocular externo contralateral (Strassman y col., 1986a,b; Scudder y col, 1988).

• **El núcleo prepositus hypoglossi.** Se acepta que este núcleo y la zona contigua del núcleo vestibular medial son partes esenciales del integrador neuronal que proporcionan la señal tónica a las motoneuronas del núcleo motor ocular externo relacionada con la posición

ocular (Fukushima y col., 1992; McFarland y Fuchs, 1992; Fukushima y Kaneko, 1995; McCrea y Horn, 2006). El núcleo prepositus hypoglossi proyecta bilateralmente al núcleo motor ocular externo y al núcleo motor ocular común, en particular, a la zona donde se localizan las motoneuronas del recto medial. Estas proyecciones se han identificado por marcaje retrógrado desde los núcleos motores oculares a los que proyecta y por marcaje transináptico (Büttner-Ennever y col., 2002; Ugolini y col., 2006).

- **Area supraoculomotora.** Esta región se localiza por encima del núcleo motor ocular común (May y col., 2008). Esta región presenta una proyección directa a los núcleos motores oculares (Zhang y col., 1991; Graf y col., 2002) y su función se ha ligado a los movimientos oculares de vergencia (Mays, 1984; Judge y Cumming, 1986; Zhang y col., 1992).

### 2.6.2. Circuito generador del movimiento sacádico y de la fijación ocular.

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, los comandos premotores para la generación de los movimientos oculares sacádicos en los planos horizontal y vertical se originan en regiones diferentes del tronco del cerebro (figura 2.7A). Las neuronas premotoras para los movimientos en el plano horizontal se localizan en la protuberancia y el bulbo raquídeo, mientras que las neuronas premotoras para los movimientos en el plano vertical se localizan en el mesencéfalo (revisado en Scudder y col., 2002; Sparks, 2002). Se han descrito varios tipos funcionales de neuronas relacionadas con los movimientos y fijaciones oculares en el plano horizontal. Las neuronas de pausa muestran una frecuencia de potenciales de acción relativamente constante durante las fijaciones oculares, pero cesan en su disparo para los sacádicos en cualquier dirección. Este cese en el disparo desinhibe a las neuronas de brote excitador. Las neuronas de brote excitador generan brotes de potenciales de acción de alta frecuencia precediendo a los movimientos sacádicos del lado homolateral y hacen contacto monosináptico con las motoneuronas del mismo lado. La amplitud, duración y velocidad del sacádico está codificada en las características del brote de potenciales de acción. Las neuronas de brote excitador también activan a las neuronas de brote inhibitor, que generan brotes de potenciales de acción para silenciar a las motoneuronas del lado contralateral. Muchas neuronas de los núcleos prepositus hypoglossi y vestibular medial generan una frecuencia sostenida de potenciales de acción que, a través de las motoneuronas, proporcionan la señal relativa a la posición del ojo. Esta señal tónica es de mayor frecuencia para las posiciones oculares más excéntricas en la dirección de activación. La entrada de la señal de posición desde el núcleo prepositus hypoglossi homolateral es excitadora e inhibitora la que procede del lado contralateral (figura 2.7B).

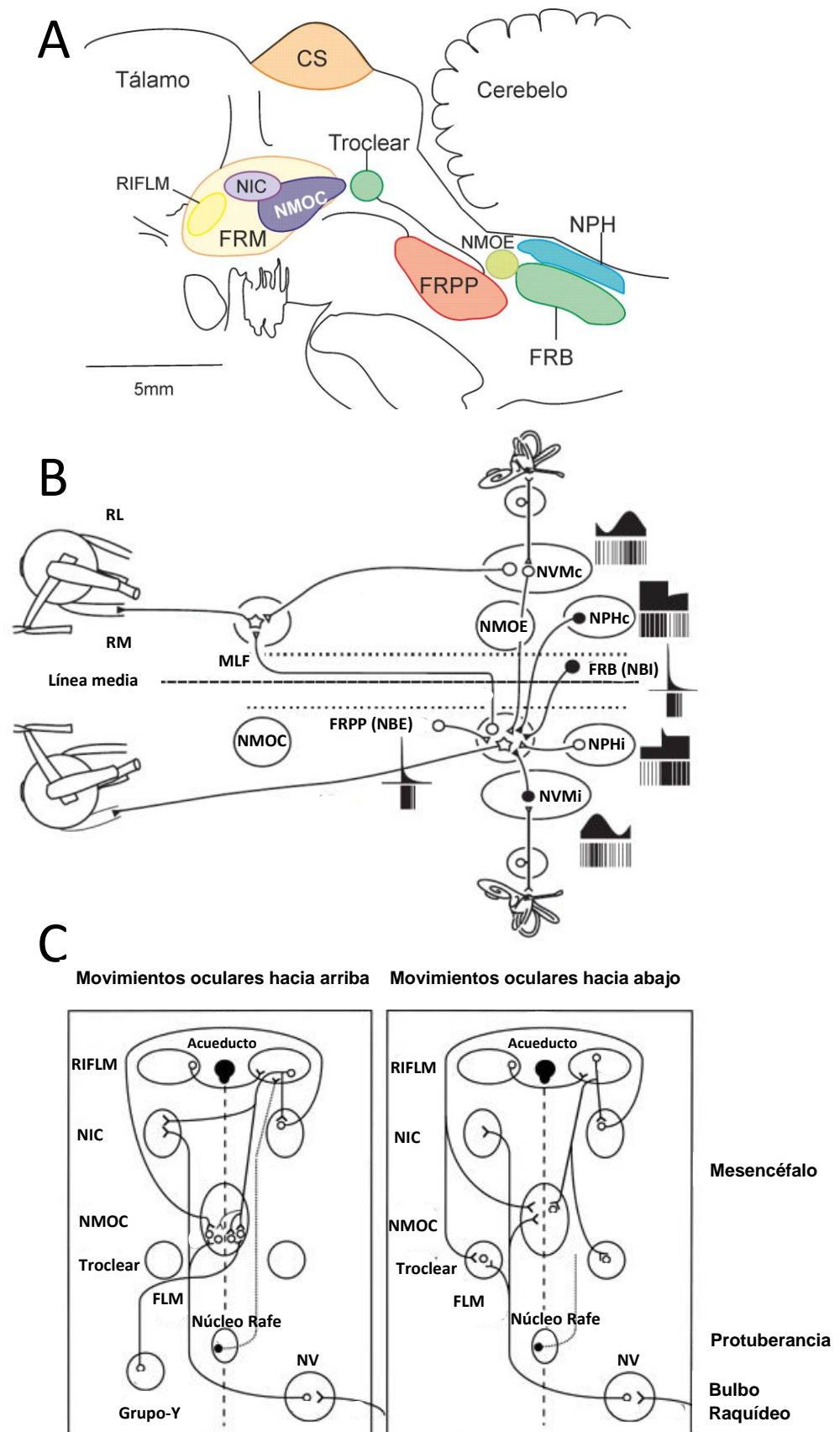


La generación de movimientos sacádicos en el plano vertical (figura 2.7D,E) depende de neuronas brote excitador situadas en el núcleo intersticial rostral del fascículo longitudinal medial. Estas neuronas están inhibidas por las neuronas de pausas, situadas en el núcleo del rafe, y proyectan a las motoneuronas de los núcleos motor ocular común y troclear, además, envían colaterales al núcleo intersticial de Cajal. Los movimientos oculares hacia arriba se producen por la activación de las motoneuronas del recto superior e inferior, los movimientos hacia abajo se producen por la activación de las motoneuronas del recto inferior y oblicuo superior. Las neuronas del núcleo intersticial de Cajal proporcionan la actividad tónica a las motoneuronas para la fijación ocular (Horn, 2006).

## 2.7. Neurotransmisores.

Las motoneuronas de los núcleos motores oculares son colinérgicas, la inmunohistoquímica para la acetilcolintransferasa resulta positiva en las motoneuronas. Los núcleos motor ocular común y troclear están constituidos por motoneuronas, mientras que el núcleo motor ocular externo contiene motoneuronas que inervan al recto lateral y neuronas internucleares (negativas para acetilcolintransferasa) cuyo axón se proyecta contralateralmente a las motoneuronas del recto medial. Las aferencias a los núcleos motores oculares son mayoritariamente glutamatérgicas y GABAérgicas (Büttner-Ennever, 2006).

- **Glutamato.** El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso central. Estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales sugieren que las motoneuronas del núcleo motor ocular común y troclear reciben aferencias excitadoras, desde neuronas localizadas en los núcleos vestibulares, mediadas por glutamato o aspartato (Dememes y Raymond, 1982; Kevetter y Hoffman, 1991; Carpenter y col., 1992; Nguyen y Spencer, 1999). La proyección desde las neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo, y las neuronas vestibulares de segundo orden que cursan por el tracto de Deiters son las principales entradas excitadoras a las motoneuronas del recto medial y sus señales están relacionadas con el control de los movimientos oculares conjugados. Las entradas sinápticas desde las neuronas internucleares del núcleo motor externo (con actividad relacionada con la posición y velocidad ocular), son, probablemente, mediadas por aspartato y glutamato, mientras que las vestibulares que cursan por el tracto de Deiters (con actividad relacionada con la velocidad de la cabeza) son glutamatérgicas. Debido a las diferencias en las señales fisiológicas que conducen, el tracto ascendente por el que cursan y la estratificación encontrada para ambas entradas sinápticas en la región de soma y dendritas de las motoneuronas del recto medial se ha sugerido un procesamiento separado



de ambas funciones (Nguyen y col., 1999). El núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial también es una fuente de entradas excitadoras (glutamato – aspartato) a los núcleos motor ocular común y troclear (Spencer y Wang, 1996; Wang y Spencer 1996, a,b). Las poblaciones de motoneuronas del núcleo motor ocular común implicadas en movimientos oculares hacia arriba (recto superior y oblicuo inferior) muestran abundantes terminales positivos para calretinina que no colocan con aquellos que son positivos para la enzima denominada descarboxilasa del ácido glutámico (marcador de terminales GABA). En base a estos estudios se ha sugerido que estos contactos pueden ser un indicador de terminaciones excitadoras, probablemente, de glutamato-aspartato. Además, combinando técnicas de inmunohistoquímica y el trazado retrógrado se ha encontrado que las neuronas calretinina positiva que proyectan al núcleo motor ocular común se localizan en el núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial, en el núcleo intersticial de Cajal y en el grupo-y. Estos estudios han concluido que las terminaciones calretinina positiva en las motoneuronas del núcleo motor ocular común pueden ser un marcador para las vías premotoras excitadoras relacionadas con los movimientos oculares hacia arriba, excluyendo a aquellas entradas sinápticas de origen vestibular (Ahlfeld y col., 2011; Zee y col., 2013; Che Ngwa y col., 2014). Por otro lado, receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato se han identificado en el núcleo motor ocular común midiendo la expresión de diferentes subunidades (Laslo y col., 2001a,b; Fuller y col., 2006; Hideyama y col., 2010). En registros de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, en el animal completo, se ha encontrado que la activación de los receptores de glutamato no produce modificaciones en la resistencia de entrada e induce una pequeña despolarización del potencial de membrana que no lleva a la motoneurona hasta el umbral de disparo (Durand y col., 1987).

**Figura 2.7. Circuitos generadores del movimiento sacádico y de la fijación ocular en los planos horizontal y vertical.** **A**, dibujo del tronco del encéfalo mostrando la localización de los núcleos implicados en los movimientos y fijaciones oculares en los planos horizontal y vertical. **B**, circuito básico para la generación de los movimientos en el plano horizontal. En el esquema se muestra que las neuronas del núcleo motor ocular externo reciben tres entradas sinápticas bilaterales y recíprocas (excitadoras / inhibitorias) desde la formación reticular, desde el núcleo prepositus hypoglossi y desde los núcleos vestibulares. El núcleo motor ocular externo incluye motoneuronas y neuronas internucleares que proyectan contralateralmente a las motoneuronas del recto medial. Se ilustra también la actividad fásica y tónica de las neuronas. **C**, circuito básico para la generación de los movimientos oculares hacia arriba y hacia abajo. Las neuronas de pausa situadas en el núcleo del rafe inhiben a las neuronas de bote localizadas en el núcleo rostral intersticial de fascículo longitudinal medial. Las neuronas de bote excitador proyectan a las motoneuronas de los núcleos motor ocular común y troclear; además, mandan colaterales al núcleo intersticial de Cajal donde se localizan neuronas de actividad tónica relacionada con la fijación de la posición ocular. Las señales que contribuyen a los movimientos de seguimiento proceden de las neuronas del grupo-y. Abreviaturas: CS, colículo superior; FLM, fascículo longitudinal medial; FRB, formación reticular bulbar; FRM, formación reticular mesencefálica; FRPP, formación reticular pontina paramediana; NBE, neuronas de bote excitador; NBI, neuronas de bote inhibitorio; NIC, núcleo intersticial de Cajal; NMOC, núcleo motor ocular común; NMOE, núcleo motor ocular externo; NPH, núcleo prepositus hipoglossi; NV, núcleo vestibular; NVM, núcleo vestibular medial, RIFLM, núcleo rostral intersticial del fascículo longitudinal medial; RL, recto lateral; RM, recto medial; formación reticular del bulbo raquídeo; Imágenes modificadas de Sparks, 2002 (A), Davis-López de Carrizosa, 2010 (B), y Leigh y Zee, 2006 (C).

Sin embargo, la activación selectiva de los receptores ionotrópicos produce un incremento en la resistencia de entrada y una despolarización del potencial de membrana que genera un disparo de potenciales de acción de forma repetitiva (Durand, 1991, 1993; Ouardouz y Durand, 1994; Ruiz y Durand, 1999).

• **GABA y glicina.** Las motoneuronas implicadas en los movimientos oculares en el plano vertical (localizadas en los núcleos motor ocular común y troclear) reciben abundantes entradas sinápticas GABAérgicas (Spencer y col., 1989; Spencer y Baker, 1992; Spencer y col., 1992). Las neuronas que originan estas proyecciones se localizan en los núcleos vestibulares homolaterales, rostral intersticial del fascículo longitudinal medial e intersticial de Cajal (de la Cruz y col., 1992; Wentzel y col., 1995; Horn y col., 2003). La información sobre la población de motoneuronas del recto medial es contradictoria: algunos autores no han encontrado diferencias en la densidad de terminaciones GABAérgicas en estas motoneuronas en relación a las otras subpoblaciones del núcleo motor ocular común y troclear (de la Cruz y col., 1992; Wentzel y col., 1995; Che Ngwa y col., 2014); por el contrario, otros autores han descrito una densidad menor de estas entradas sinápticas (Spencer y Baker, 1992; Waldvogel y col., 2010).

Las entradas inhibitorias a las motoneuronas del núcleo motor ocular externo son, esencialmente, glicinérgicas (Spencer y Baker, 1992) y algunas de las mismas proceden del núcleo prepositus hypoglossi (Spencer y col., 1989). Por otro lado, se ha sugerido que las entradas glicinérgicas en las motoneuronas del recto medial podrían contribuir a la transmisión excitadora, ya que la glicina es un modulador de los receptores de glutamato tipo NMDA (Nguyen y Spencer, 1999).

• **Acetilcolina.** Combinando trazado retrógrado e inmunohistoquímica para la acetilcolintransferasa se ha encontrado que algunas neuronas que proyectan al núcleo motor ocular común desde los núcleos paragigantocelular y vestibular medial son colinérgicas (Carpenter y col., 1992). Además, se han observado en el neuropilo del núcleo motor ocular común terminales axónicos positivos para el transportador vesicular de la acetilcolina (Ichikawa y Shimizu, 1998; Hellström y col., 2003). En base a estos conocimientos y a datos funcionales, que demuestran que las entradas colinérgicas modulan la excitabilidad de neuronas del tronco del encéfalo (Fernández de Sevilla y col., 2006) e incluso podrían participar en el proceso de integración desde señales de velocidad ocular hasta señales de posición ocular en el núcleo prepositus hypoglossi (Navarro-López y col., 2004), se planteó la hipótesis de trabajo de si las entradas sinápticas colinérgicas podrían ejercer influencia sobre la excitabilidad de las motoneuronas oculares. Los resultados

obtenidos demuestran que estas entradas sinápticas, actuando a través de receptores muscarínicos, son capaces de modular ligeramente el umbral de reclutamiento y la ganancia de la relación entre frecuencia de disparo y corriente inyectada (Nieto-González y col., 2009). Las entradas colinérgicas están presentes en las ratas neonatales, pero los efectos de su activación incrementan con la edad (Carrascal y col., 2010). Dado que los resultados obtenidos en estos estudios no permitían revertir las relaciones obtenidas *in vitro* a aquellas observadas *in vivo*, en esta Tesis Doctoral se abordó el estudio de qué papel juegan las entradas glutamatérgicas y GABAérgicas en estas relaciones.

### **2.7.1. Modulación de la excitabilidad por neurotransmisores.**

La liberación de los neurotransmisores\* y su unión a los receptores situados en la membrana postsináptica alteran las conductancias iónicas y generan corrientes. Si estas corrientes despolarizan la membrana por encima del valor de voltaje umbral se producen potenciales de acción cuya frecuencia depende de la intensidad de la corriente neta despolarizante y permiten la transmisión de información de una neurona a otra. Por otro lado, en las dos últimas décadas se han acumulado evidencias que demuestran que los neurotransmisores pueden actuar, además, modulando la excitabilidad neuronal (Sharifullina y col., 2004; Hassel y Dingledine, 2006; Waxham, 2013). Los mecanismos de modulación alteran la probabilidad y cinética de apertura o cierre de canales y modifican las corrientes iónicas en la neurona. Esta acción se origina en lugares alejados del complejo sináptico y su función es modificar las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de membrana. La acción moduladora de los neurotransmisores ha sido, clásicamente, atribuida a receptores metabotrópicos (véase más adelante, por ejemplo, las acciones fisiológicas de los receptores metabotrópicos para glutamato). Sin embargo, se ha descrito también que receptores ionotrópicos para GABA, situado en regiones perisinápticas, pueden realizar un papel de modulador de la excitabilidad neuronal (Semyanov y col., 2004; Farrant y Nusser, 2005).

### **2.7.2. Receptores de glutamato.**

El glutamato\*\* es el principal neurotransmisor excitador del cerebro en mamíferos y de las motoneuronas oculares (véase sección 2.6.3). Los receptores de glutamato se

---

\*Las acciones fisiológicas de cualquier neurotransmisor en una determinada estructura se puede estudiar en función de la tasa de biosíntesis, liberación o recaptación. Dado que en el abordaje experimental empleado en esta Tesis se evalúan los efectos de activación y bloqueo de receptores, se describirán las características principales estructurales y funcionales de estos componentes.

\*\*El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, debe ser sintetizado en las neuronas a partir de precursores locales. El precursor más importante es la glutamina que es liberada por las células gliales y captada por las terminaciones presinápticas. También puede ser sintetizado a partir de la transaminación de 2-oxoglutarato.

clasifican en dos grupos: *los receptores ionotrópicos*, son canales catiónicos y están implicados en la transmisión rápida; *los receptores metabotrópicos* no forman canales sino que están acoplados a proteínas G que regulan la actividad de enzimas y canales iónicos, producen respuestas postsinápticas lentas y tienen un papel modulador de la excitabilidad neuronal (Hassel y Dingledine, 2006).

• **Receptores ionotrópicos de glutamato.** Estos receptores presentan sitios de unión al neurotransmisor (o moléculas agonistas) que están asociados al complejo macromolecular del canal. La unión del neurotransmisor o de las moléculas agonistas incrementa la probabilidad de apertura del canal. Los receptores son complejos tetraméricos de subunidades ensambladas, generalmente, como dímeros de dímeros (figura 2.8A). Las subunidades tienen una estructura semejante con un dominio nitrogenado terminal en el lado extracelular, cuatro segmentos hidrofóbicos (3 transmembranarios M1, M3, M4, mientras que M2 se introduce solo parcialmente en la membrana estando más cerca del lado intracelular) y un carboxilo terminal hacia el lado intracelular (Wollmuth y Sobolevsky, 2004; Mayer, 2005;).

Existen 16 subunidades diferentes (figura 2.8C) y, según se combinen, las propiedades electrofisiológicas del canal son diferentes (Hammond, 2008). Los receptores ionotrópicos de glutamato se han dividido en tres clases atendiendo a las moléculas agonistas específicas:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), ácido kaínico (KA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). La permeabilidad de los receptores AMPA es esencialmente a sodio y potasio (la presencia de la subunidad GluR2 lo hace impermeable a calcio), cuando el canal se abre la corriente de sodio es de mayor intensidad (potencial de reversión  $\sim 0$  mV). Los receptores de kainato permiten el paso de sodio y potasio, la corriente de calcio es muy escasa. La permeabilidad de los receptores NMDA tienen dos características que les diferencia del modelo convencional de ligando – receptor. Por un lado, la apertura del canal requiere de un coagonista (glicina). Por otro lado, cuando el potencial de membrana es inferior a  $-50$  mV, la concentración de magnesio del líquido extracelular es suficiente para abolir el flujo de iones a través de los canales de NMDA.

A medida que las células se despolarizan la afinidad del magnesio por su sitio de unión disminuye, siendo el bloqueo más ineficaz, y cuando el poro se abre muestra una alta permeabilidad al calcio, aunque también permite el paso de sodio y potasio. El aumento de calcio intracelular, mediado por la apertura de estos receptores, activa cascadas intracelulares que promueven la inserción en la membrana de receptores AMPA y la

reorganización del citoesqueleto. Estos cambios modifican la eficacia sináptica de forma persistente en un fenómeno conocido como potenciación a largo plazo (LTP).

• **Receptores metabotrópicos de glutamato** (Hassel y Dingledine, 2006; Fagni, 2008). Los receptores metabotrópicos de glutamato están formados por una única cadena polipeptídica con su grupo amino terminal hacia el espacio extracelular, con siete dominios transmembrana y con el grupo carboxilo terminal hacia el lado intracelular (figura 2.8B). Estos receptores se han clasificado en tres grupos (figura 2.8C) en base a la homología en la secuencia de aminoácidos y los mecanismos de señalización intracelular. Cada grupo tiene moléculas agonistas selectivas que los activa. Estos receptores metabotrópicos de glutamato están ligados a proteínas G. Los receptores del grupo I estimulan la actividad de la fosfolipasa C, la formación de inositol trifosfato y la liberación de calcio al citoplasma desde los lugares de almacenamiento. Además, promueve la formación de mensajeros lipídicos y la activación de proteína-quinasa C. Los receptores del grupo II y III inhiben la adenilato-ciclase y disminuyen la formación de AMPc. Los receptores del grupo I se localizan mayoritariamente en el componente postsináptico. Los del grupo II y III se localizan a nivel presináptico y postsináptico.

Los receptores metabotrópicos de glutamato modulan dos funciones neuronales: excitabilidad y transmisión sináptica (Takashahi y col., 1996; Anwyl, 1999; Young y col. 2004; Hassel y Dingledine, 2006; Fagni, 2008). Los cambios en excitabilidad han sido atribuidos a modificaciones en las conductancias de potasio dependientes de calcio, que intervienen en la fase de posthiperpolarización del potencial de acción y modulan el disparo repetitivo; al bloqueo de las corrientes de fuga de potasio y a las corrientes catiónicas persistentes. La modulación de la liberación del transmisor ha sido atribuida a la inhibición directa de canales de calcio en el terminal presináptico (Fagni, 2008).

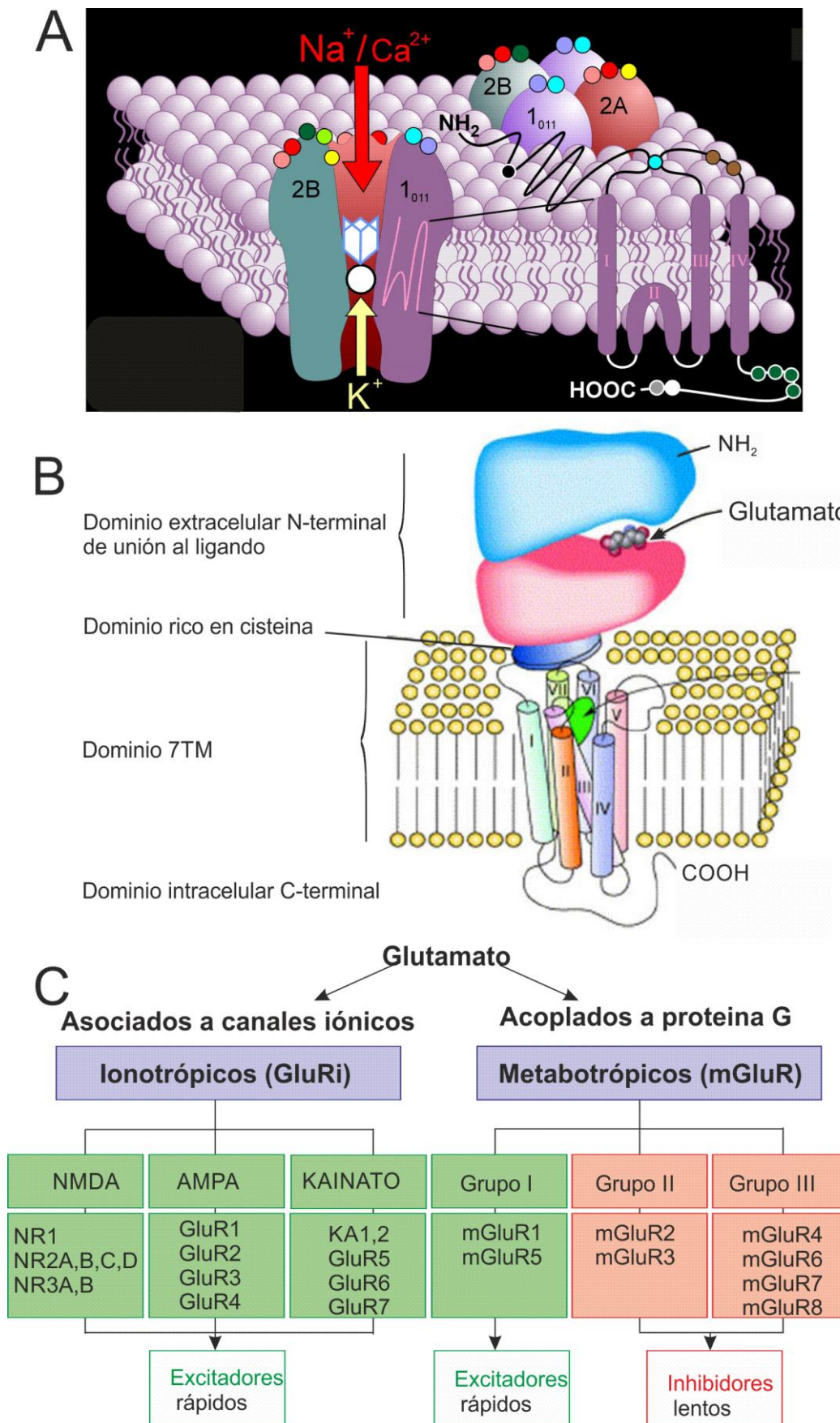
### 2.7.3. Receptores de GABA.

El GABA\* es reconocido por tres tipos de receptores postsinápticos GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son receptores ionotrópicos permeables a cloro. El receptor GABA<sub>B</sub> es un receptor metabotrópico y su activación produce la apertura de canales de potasio o el bloqueo de los canales de calcio que hiperpolarizan la membrana. La estructura del receptor de GABA está formada por la combinación de siete tipos

---

\*El precursor en la síntesis de GABA es la glucosa. La glutámico decarboxilasa (GAD) es la enzima que cataliza la conversión de glutamato en GABA. Una vez sintetizado el neurotransmisor se transporta hacia las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de GABA. La recaptación del GABA se realiza a través de transportadores, denominados GAT, situados en las células de la glía y en las neuronas.





**Figura 2.8. Estructura y función de los receptores de glutamato.** **A**, dibujo mostrando la composición tetramérica, generalmente formando dímeros, del receptor de glutamato y la estructura de cada subunidad. **B**, Estructura del receptor metabotrópico de glutamato. **C**, Esquema mostrando las familias moleculares del receptor de glutamato. Imágenes tomadas de: <http://chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm> (A, B); Blackshaw y col., 2011 (C).

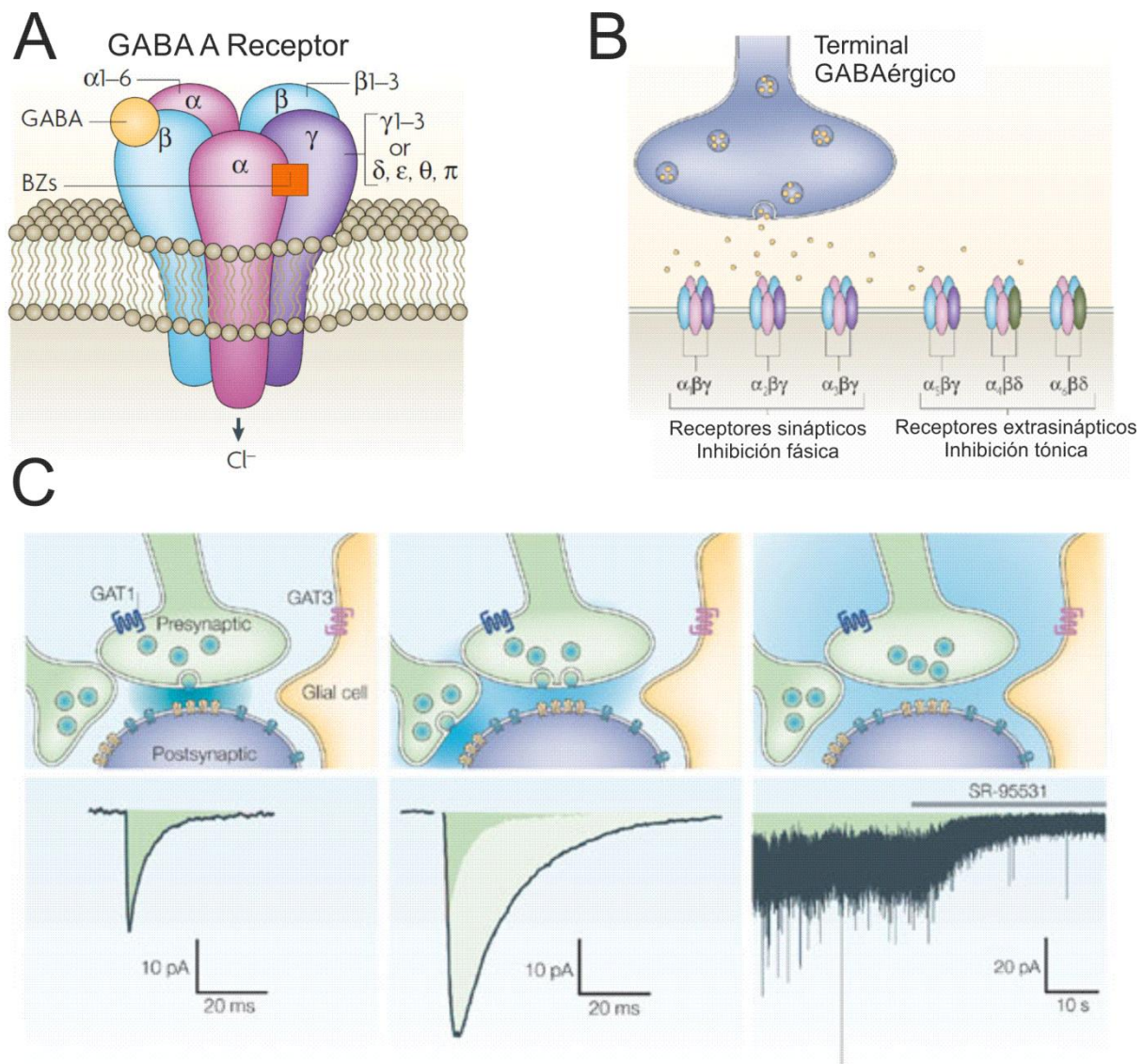


de subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ) en heterodímeros y contiene dos sitios de fijación para GABA (figura 2.9A). Se ha demostrado que los receptores GABA<sub>A</sub> pueden clasificarse por su activación en fásicos o tónicos (figura 2.9B; Farrant y Nusser, 2005; Glycks y Mody, 2007).

• **Receptor GABA<sub>A</sub> de activación fásica.** La llegada de potencial de acción al terminal presináptico provoca la entrada de calcio, la fusión y la liberación del contenido de las vesículas a la hendidura sináptica. Cada vesícula contiene varios miles de moléculas de GABA, pero en la membrana postsináptica solo se encuentran un pequeño número de receptores (10-100) que cuando aumenta la concentración de GABA en el espacio sináptico se abren de forma sincrónica. Los receptores para GABA de acción fásica se caracterizan por la corta duración de exposición del neurotransmisor al receptor (figura 2.9C). Cuando se registran células con corrientes postsinápticas inhibitoras en miniatura, generadas por la liberación de GABA de una única vesícula, se observa un inicio rápido y un tiempo corto de extinción de la corriente que refleja la proximidad de los receptores al sitio de liberación de GABA. Cuando llega un potencial de acción se liberan un número variable de vesículas y se produce una corriente postsináptica de mayor amplitud y duración pero su acción ocurre también en un breve plazo (<100 ms; figura 2.9C). La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> fásicos es fundamental para la transmisión de información (Pouille y Scanziani, 2001) y para la sincronización de redes neuronales (Sebe y col., 2006; Mann y Paulsen, 2007).

• **Receptor GABA<sub>A</sub> de activación tónica.** Las corrientes inhibitoras tónicas actúan en una escala de tiempo más lenta y tiene lugar de una forma menos restringida en el espacio ya que es mediada por receptores de alta afinidad localizados en regiones extrasinápticas. Estos receptores son sensibles a bajas concentraciones de GABA en el medio extracelular, que se pueden originar por difusión del neurotransmisor desde la hendidura sináptica o por mecanismos asociados a los recaptadores (Semyanov y col., 2004; Farrant y Nusser, 2005; Glykys y Mody, 2007). Se ha propuesto que los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un papel importante en modular la excitabilidad, mediante mecanismos que modifican el umbral de reclutamiento del potencial de acción y por cambios en la resistencia de la neurona (Ruiz y col., 2003; Petrini y col., 2004; Kullmann y col., 2005). La gabazina y la bicuculina, antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub>, producen el bloqueo de la corriente transitoria, mediada por los receptores fásicos, y de la tónica. La presencia de conductancias tónicas mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad se ha demostrado en diferentes estructuras del sistema nervioso central como el cerebelo (Brickley y col., 1996) o el hipocampo (Semyanov y col., 2003). A pesar de estos conocimientos, la corriente inhibitora tónica mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> no ha sido descrita en las motoneuronas oculares,

y los datos sobre otras poblaciones de motoneuronas son escasos (Castro y col., 2011; Numata y col., 2012).



**Figura 2.9. Receptores GABA<sub>A</sub>.** **A**, el receptor GABA<sub>A</sub> está formado por cinco subunidades de siete subfamilias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ) que se ensamblan para formar un canal permeable a cloro. La mayor parte de los receptores expresan dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\gamma$  puede ser reemplazada por  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ . El neurotransmisor GABA se une en la interfaz entre los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , favoreciendo la apertura del canal y permitiendo la entrada rápida de cloro. Las benzodiazepinas se unen en las interfaces entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  y potencia el flujo de cloro producido por el GABA. **B**, los receptores compuestos por las subunidades  $\alpha$  (1-3),  $\beta$ ,  $\gamma$  se localizan en la región sináptica, mientras que  $\alpha 5$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  se localiza en la región extrasináptica. También se localizan en la región extrasináptica los receptores compuestos por  $\alpha$  (1-3),  $\beta$  y  $\delta$ . **C**, Izquierda, la liberación de una vesícula de GABA activa a los receptores sinápticos y difunden. El registro corresponde a la corriente postsináptica en miniatura registrada en presencia de tetrodotoxina. El área verde coloreada corresponde a la medición de transferencia de carga. GAT corresponde al transportador de GABA. Centro, los potenciales de acción favorecen la liberación de múltiples vesículas, el neurotransmisor activa a los receptores sinápticos y perisinápticos o extrasinápticos (coloreados en azul). El registro de corriente muestra un promedio mayor y más lento de corriente postsináptica en relación a la de miniatura. Derecha, una baja concentración de GABA ambiente, el cual persiste a pesar de la actividad neuronal y los transportadores gliales, activa tónicamente a los receptores extrasinápticos de alta afinidad. El registro corresponde a la corriente tónica y a los eventos sinápticos espontáneos de corriente fásica. Una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de gabazina bloquea las corrientes inhibitoras fásicas y tónicas. El área coloreada en verde representa la carga neta transferida a través de los receptores tónicos activos. Imágenes tomadas de Jacob y col., 2008 (A,B); Farrant y Nusser, 2005 (C).

### **3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS.**



### 3.1. Planteamientos y objetivos generales.

La relación neuronal de entrada-salida puede ser modulada por neurotransmisores modificando el umbral de reclutamiento neuronal y la ganancia de la relación. Estos mecanismos refinan la actividad de la neurona ya que, por un lado, la modificación en el umbral permite que una neurona sea reclutada con estímulos de menor o mayor intensidad en relación a la situación control y, por otro lado, la modificación en la ganancia permite amplificar o atenuar la respuesta a un estímulo en relación a la situación control. En este contexto de control de la actividad neuronal, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar los mecanismos de modulación del umbral de reclutamiento y la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las motoneuronas del núcleo motor ocular común por los neurotransmisores glutamato y GABA. En los párrafos siguientes se resumen algunos de los hallazgos básicos, presentados en la introducción, que sustentan el interés por los objetivos específicos de este estudio.

Las motoneuronas oculares muestran un patrón tónico-fásico de disparo de potenciales de acción. Cada motoneurona comienza a disparar cuando el ojo alcanza una cierta posición en la órbita y la frecuencia de disparo incrementa linealmente con las posiciones oculares más excéntricas en la dirección de activación. La pendiente de esta relación (denominada  $k$ ) indica la sensibilidad de cada neurona a la posición ocular. El umbral de reclutamiento y  $k$  se distribuyen en un amplio rango en la población de motoneuronas, asegurando una fina graduación de la fuerza a realizar para mantener estable la posición ocular. Además, el umbral de reclutamiento y  $k$  covarían positivamente: motoneuronas con umbrales de reclutamiento mayores muestran también mayores valores de  $k$ . Las motoneuronas oculares también muestran un brote de potenciales de acción (actividad fásica) linealmente relacionada con la velocidad del movimientos ocular. La pendiente de esta relación (denominada  $r$ ) indica la sensibilidad de cada motoneurona a la velocidad ocular. El umbral de reclutamiento y  $r$  también están positivamente relacionados. Los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en preparaciones *in vitro* sugieren que las propiedades intrínsecas de membrana no determinan la relación entre umbral de reclutamiento y sensibilidad a la posición ocular. Además, estudios *in vivo* y de simulación neuronal apoyan la hipótesis de que esta relación podría deberse a mecanismos de modulación de la excitabilidad neuronal mediado por neurotransmisores.

La liberación de los neurotransmisores y su unión a los receptores de membrana situados en la membrana postsináptica alteran las conductancias iónicas (vía apertura o cierre de canales) y, como consecuencia, generan corrientes. Si estas corrientes despolarizan o hiperpolarizan la membrana incrementan o disminuyen la excitabilidad neuronal. Por otro lado, se han acumulado evidencias que demuestran que los neurotransmisores pueden actuar modulando la excitabilidad neuronal desde lugares alejados del complejo sináptico mediante la modificación de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de membrana. Estos mecanismos alteran la probabilidad y cinética de apertura o cierre de canales y, por tanto, modulan las conductancias y corrientes iónicas en el soma. La acción moduladora de los neurotransmisores se ha atribuido, generalmente, a receptores metabotrópicos que actúan a través de sistemas de señalización intracelular. Recientemente se ha descrito la presencia de receptores ionotrópicos para el neurotransmisor GABA situado en regiones extrasinápticas capaces de modular la excitabilidad neuronal. Estudios ultraestructurales, inmunohistoquímicos y electrofisiológicos han demostrado que los neurotransmisores glutamato y GABA son los más abundantes en las sinapsis que reciben las motoneuronas oculares. El objetivo general de este trabajo fue investigar, por un lado, la modulación del umbral de reclutamiento y de la ganancia en la frecuencia de potenciales de acción mediada por estos neurotransmisores y, por otro lado, si los efectos de estos sistemas de modulación dependen de tamaño neuronal.

### 3.2. Objetivos específicos.

- Determinar si la población de motoneuronas estudiadas, en la ventana de edad elegida (entre 15 y 25 días tras el nacimiento), están de acuerdo al principio del tamaño.
- Determinar si las motoneuronas del núcleo motor ocular común reciben entradas glutamatérgicas y GABAérgicas en la rata joven.
- Cuantificar el efecto del glutamato y del GABA sobre las siguientes propiedades electrofisiológicas de membrana:
  - ✓ Potencial de membrana.
  - ✓ Resistencia de entrada y constante de tiempo.
  - ✓ Reobase, voltaje de despolarización y voltaje umbral
  - ✓ Relación entre intensidad de corriente inyectada y frecuencia de potenciales de acción generada.
  - ✓ Frecuencia fásica de disparo de potenciales de acción.
  - ✓ Índice de adaptación del disparo repetitivo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**





#### 4.1. Sujetos.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar jóvenes (de 15 a 25 días) de ambos sexos. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Directiva de la Comunidad Europea 2003/65, así como al Real Decreto español 120/2005 y a las regulaciones de la Universidad de Sevilla para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

#### 4.2. Preparaciones de rodajas cerebrales.

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) previamente a su sacrificio. Una vez desaparecido el reflejo de retracción de la extremidad posterior y el de parpadeo, el animal se perfundió transcardíacamente con líquido cefalorraquídeo artificial modificado con sacarosa a  $4^\circ\text{C}$  y se decapitó. El cerebro se extrajo rápidamente, se colocó en una placa de Petri con líquido cefalorraquídeo modificado con sacarosa y se retiró el prosencéfalo. El tejido restante que contenía la zona de estudio o mesencéfalo se cortó en secciones transversas de  $300 \mu\text{m}$  usando un vibratomo (Leica VT1200S, figura 4.1A). Las rodajas cerebrales se colocaron durante 30 minutos en una cámara rellena de líquido cefalorraquídeo artificial a  $\sim 36^\circ\text{C}$  (figura 4.1B,C), y luego se mantuvieron durante un periodo  $<6$  horas a  $\sim 21^\circ\text{C}$  en la misma solución. Sólo las rodajas que contenían núcleo motor ocular común se pasaron a la cámara de registro (figura 4.1D-E), dónde se perfundieron con líquido cefalorraquídeo artificial (pH 7.4;  $32^\circ\text{C}$ ) con una bomba peristáltica (Harvard apparatus MPII o Ismatec ISM832C) a una tasa de  $2 \text{ mL/min}$ . El líquido cefalorraquídeo se burbujeó con una mezcla de gases que contenía  $95\% \text{ O}_2$  -  $5\% \text{ CO}_2$ . La composición del líquido cefalorraquídeo artificial fue la siguiente (datos en mM):  $126 \text{ NaCl}$ ,  $2 \text{ KCl}$ ,  $1,25 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $26 \text{ NaHCO}_3$ ,  $10$  glucose,  $2 \text{ MgSO}_4$ , and  $2 \text{ CaCl}_2$ . En la solución de líquido cefalorraquídeo modificado con sacarosa, el  $\text{NaCl}$  fue sustituido por sacarosa ( $240 \text{ mM}$ ).

#### 4.3. Soluciones farmacológicas.

Todos los fármacos se prepararon previamente a la realización de los experimentos en soluciones stock ( $10 - 20 \text{ mM}$ ) y éstas fueron almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . Los experimentos incluían el registro de la misma motoneurona antes (control) y durante la aplicación de los fármacos. Para estudiar la respuesta de las motoneuronas del núcleo motor ocular común a los neurotransmisores, tras el registro en la condición control, las rodajas se perfundieron con líquido cefalorraquídeo que contenía glutamato ( $5 \mu\text{M}$ , L-glutamic acid, Sigma-Aldrich, condición glutamato) o GABA ( $100 \mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -aminobutyric acid, Tocris, condición GABA) a una tasa de  $2 \text{ mL/min}$  (pH 7.4;  $32^\circ\text{C}$ , TC-324B Warner Instruments), y 3-4 minutos después de la perfusión con estos fármacos se volvieron a repetir los registros. El tiempo de intercambio

en la cámara de registro entre el líquido cefalorraquídeo artificial y las soluciones con glutamato o GABA fue de ~50 s. Por otro lado, la corriente tónica GABA<sub>A</sub> se puso de manifiesto mediante el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con el antagonista 2-(3-carboxypropyl) - 3-amino-6-methoxyphenyl-pyridazinium bromide [SR95531, gabazina, 20  $\mu$ M; Tocris]. En este caso la gabazina fue añadida directamente a la cámara de registro y no perfundida como en los casos anteriores junto con el líquido cefalorraquídeo. Con el objetivo de evitar resultados erróneos consecuencia de un lavado incompleto de los fármacos se analizó una única motoneurona por rodaja.

La finalidad de este proyecto fue estudiar los efectos modulatorios del glutamato o GABA, sobre el umbral de reclutamiento y la ganancia de la frecuencia del disparo, mediante registro intracelular con dos aproximaciones experimentales diferentes. Los estudios relacionados con el glutamato se realizaron con electrodos de punta fina, mientras que los relacionados con GABA se llevaron a cabo con electrodos de patch en la configuración de whole-cell o célula completa.

#### **4.4. Registros electrofisiológicos y análisis de las condiciones control vs. glutamato.**

##### **4.4.1. Registros electrofisiológicos.**

Los microelectrodos se obtuvieron utilizando un estirador de pipetas horizontal (Sutter P97, figura 4.1F) a partir de tubos de vidrio de borosilicato de 1 mm con capilar interno (World Precision Instruments, WPI). Los microelectrodos se rellenaron con KCl 3 M y se usaron aquellos que presentaron una resistencia de 30-60 M $\Omega$ . La punta del electrodo de apenas 0.2  $\mu$ m de grosor (imagen superior de la figura 4.1G) se posicionó en la zona elegida de la rodaja con un micromanipulador manual con una precisión de avance de 0,2  $\mu$ m (Sutter MM-33).

---

**Figura 4.1. Preparación y mantenimiento de rodajas cerebrales, localización de la estructura y elaboración de microelectrodos.** **A**, vibratomo. **B**, imagen mostrando la cámara de incubación situada en el baño termostático para mantener la temperatura constante y monitorizando el pH. **C**, fotografía mostrando las rodajas cerebrales que contienen el núcleo motor ocular común situadas en los pocillos de la cámara de incubación. Nótese el leve burbujeo debido a la continua oxigenación del líquido cefalorraquídeo. **D,E** fotografía mostrando la localización de las motoneuronas del núcleo motor ocular común en la rodaja. La imagen corresponde a una tinción con acetilcolintransferasa. **F**, estirador de pipetas horizontal. **G**, electrodos. En la parte superior se muestra un electrodo de punta fina, en la parte central un electrodo de patch y en la parte inferior un electrodo bipolar de estimulación.

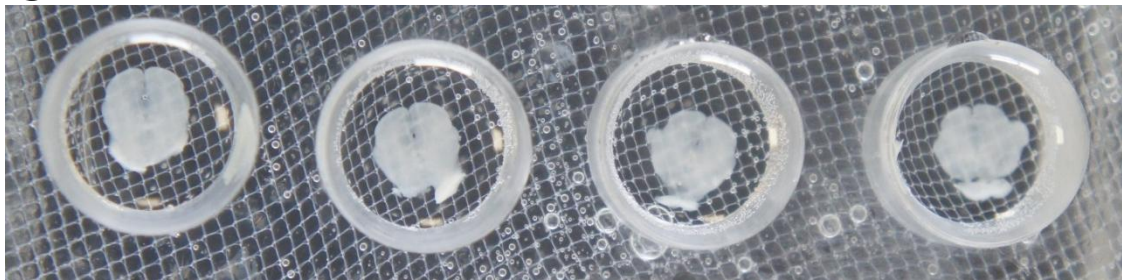
A



B



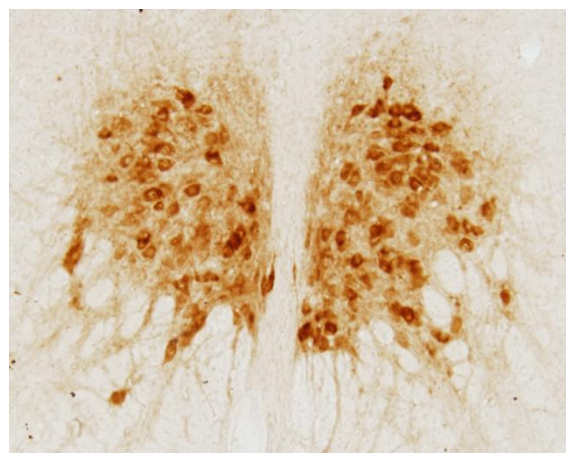
C



D



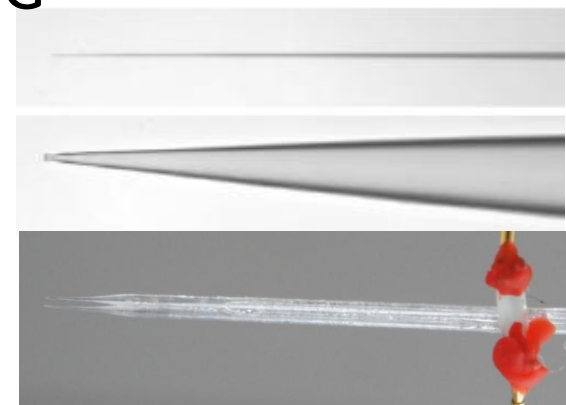
E



F



G



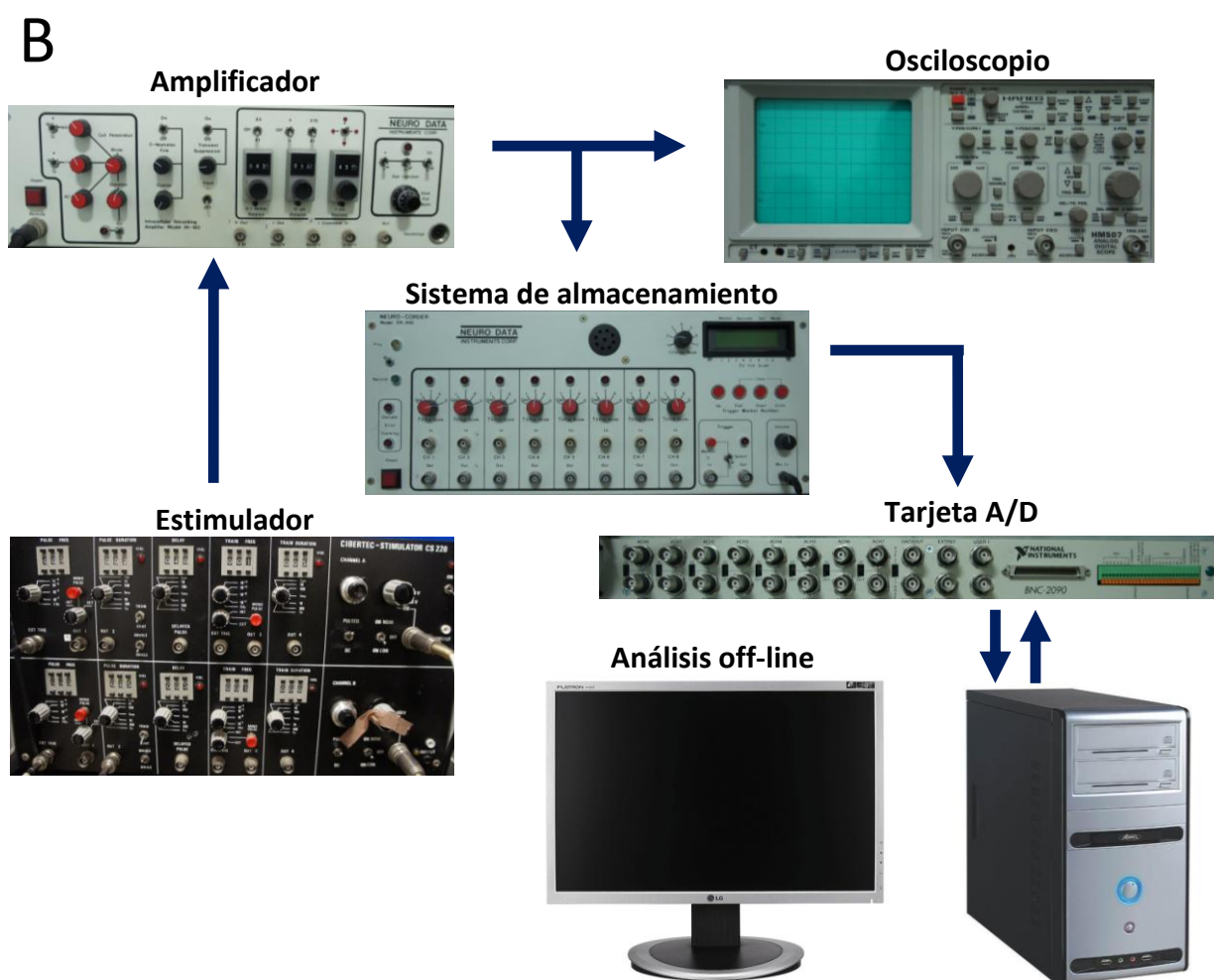
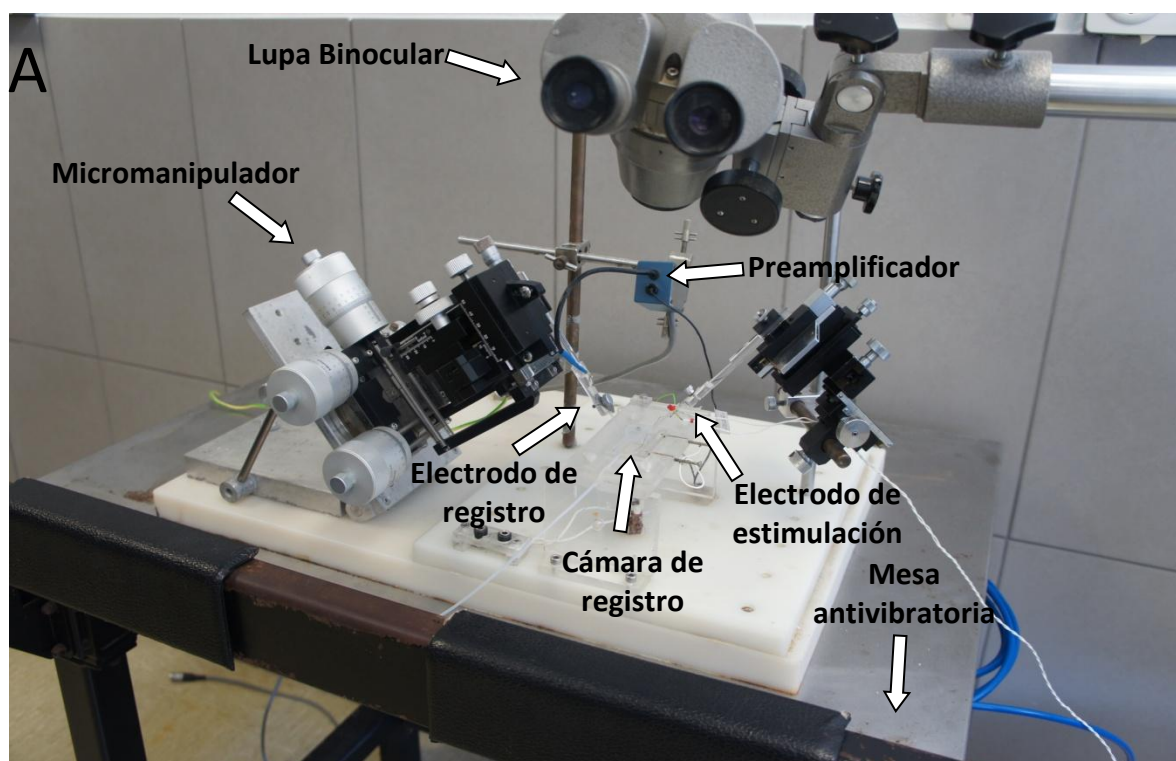
La figura 4.2A muestra la disposición de los equipamientos durante las sesiones experimentales. La cámara de registro, el micromanipulador y un microscopio (40X, Olympus) se colocaron en una mesa antivibratoria (TMC, Micro-g). Esta figura incluye también la localización de un electrodo bipolar usado para la identificación de las motoneuronas y para evocar potenciales sinápticos. El electrodo bipolar de estimulación se construyó con hilo de acero inoxidable de 25  $\mu\text{m}$  aislado por una micropipeta de vidrio y las puntas del microelectrodo tenían una separación entre 250 y 500  $\mu\text{m}$  (detalle en parte inferior de figura 4.1G). La figura 4.2B muestra los equipos utilizados para el registro, almacenamiento y análisis de las señales electrofisiológicas. El potencial de membrana y las corrientes inyectadas se registraron con un amplificador de intracelular (Neuro Data IR-183). Los pulsos de corrientes se generaron con un estimulador (Cibertec CS220) y luego se amplificaron. El potencial de membrana y las corrientes inyectadas se monitorizaron en un osciloscopio (Hameg HM507), y se guardaron en un sistema de almacenamiento de señal (Neuro-corder DR890, Neuro Data) para su posterior análisis.

#### 4.4.2. Análisis de los registros electrofisiológicos.

La señal electrofisiológica almacenada en soporte magnético se adquirió a través de una tarjeta digitalizadora (National Instruments PCI-6070E) en un ordenador. Las señales adquiridas en el ordenador se analizaron mediante el programa Diadem 11.0 (National Instruments) (figura 4.3). Todas las motoneuronas incluidas en el análisis mostraron un potencial de membrana de reposo estable de al menos -55 mV, una amplitud de potencial de acción mayor de 60 mV, y un disparo repetitivo en respuesta a pulsos de corriente supra umbrales despolarizantes de 1 segundo de duración. La medida de resistencia fue monitorizada continuamente y ajustada antes y después del empalamiento celular. El electrodo se balanceó continuamente durante el registro. La estabilidad del potencial de membrana, resistencia de entrada, reobase y las características del potencial de acción fueron medidas sistemáticamente durante el registro para asegurar la calidad del empalamiento. Los registros que mostraron deterioros en estas propiedades fisiológicas fueron descartados.

---

**Figura 4.2. Sistema de registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica en los experimentos de glutamato.** A, fotografía ilustrando la localización de la cámara y los accesorios de registro. B, fotografía ilustrando los equipos utilizados para el registro y almacenamiento de las señales electrofisiológicas.

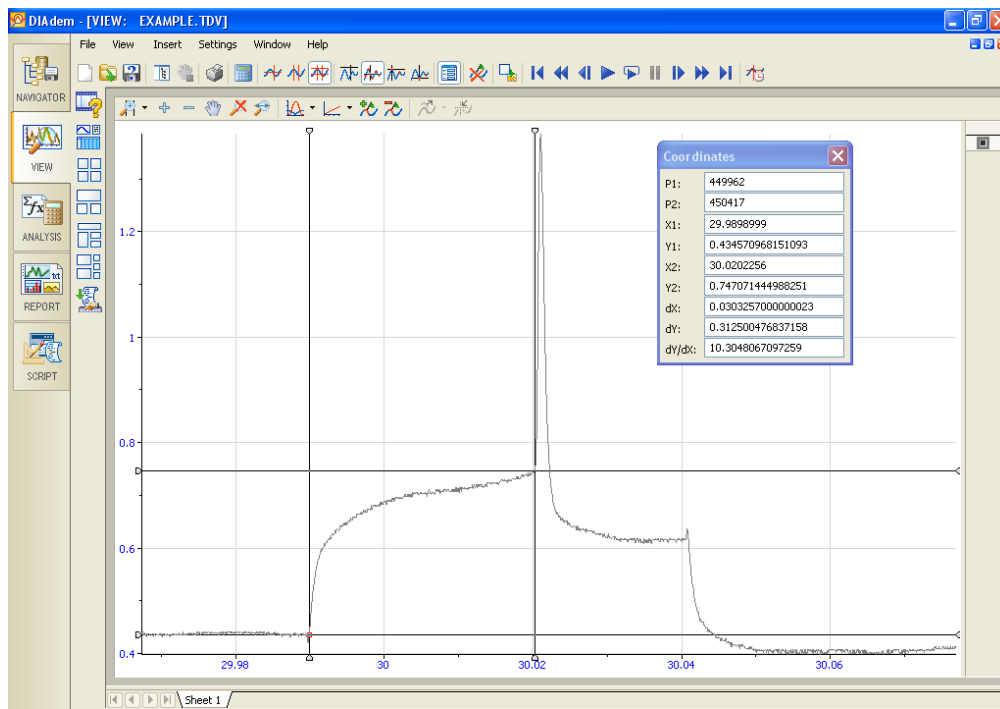


El potencial de membrana se midió como la diferencia entre los potenciales intra y extracelular al retirar el electrodo de la célula. La resistencia de entrada se determinó con inyecciones de pulsos de corriente negativa (500 ms, 1 Hz; con incrementos de 0,1 nA). La resistencia de entrada se calculó como la pendiente de la relación existente entre corriente y voltaje (relación  $I-V$ ). La reobase se consideró como la corriente mínima a la que se produjo el potencial de acción en el 50% de los casos y se determinó aplicando pulsos de corriente despolarizantes (50 ms, 2 Hz, en pasos de 0,05 nA). El voltaje de despolarización fue el incremento en el potencial de membrana requerido para llevar la célula al umbral de disparo (figura 4.3A). Para determinar el umbral, el potencial de acción registrado fue analizado; el inicio de los potenciales de acción se tomó siempre como el valor del potencial de membrana al cual la primera derivada supera los 10 V/s.

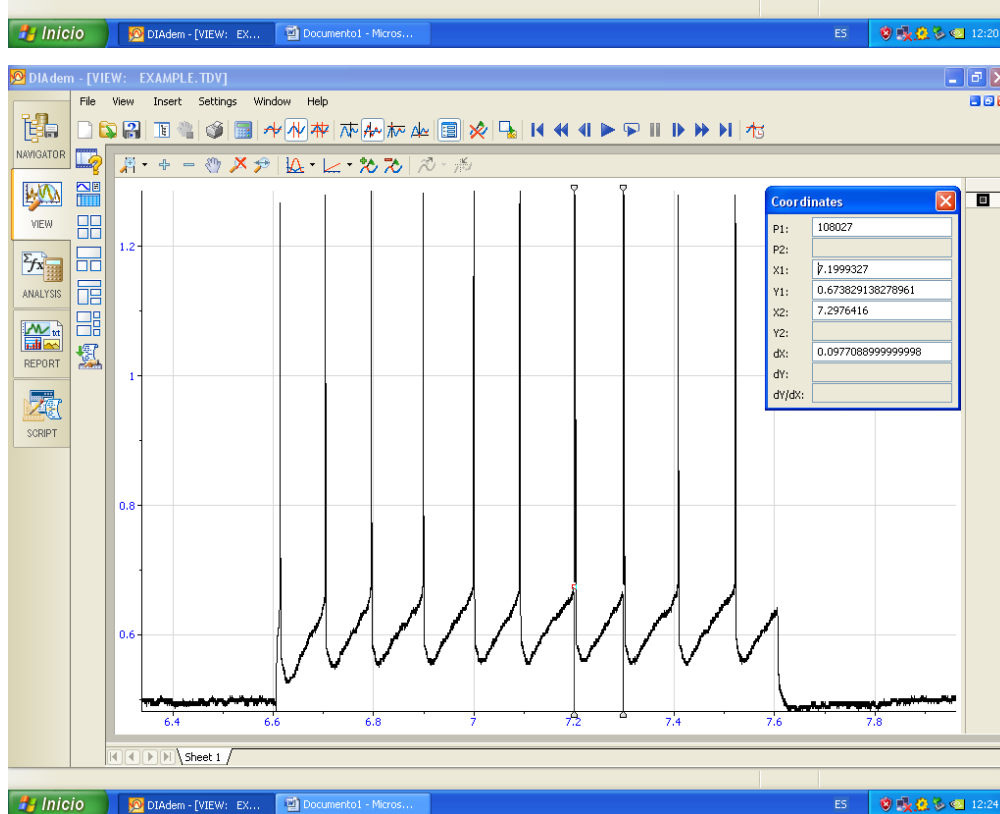
El componente tónico del disparo repetitivo fue medido con pulsos de corriente despolarizantes (1 s, 0,5 Hz) con incrementos de 0,05 nA. El estado estable de la frecuencia de disparo se calculó cuantificando la media del número de potenciales de acción durante los últimos 500 ms (figura 4.3B). La ganancia de la frecuencia de disparo se calculó como la pendiente de la relación existente entre la frecuencia de disparo en el estado estable y la corriente aplicada (relación  $I-F$ ). La corriente umbral de reclutamiento del disparo repetitivo se definió como la intensidad mínima de corriente despolarizante que producía un disparo sostenido y regular. Para medir la variabilidad del disparo repetitivo se tomaron diferentes tasas de frecuencias e intensidades de corrientes para cada motoneurona y se midió la duración de los intervalos interespigas. El coeficiente de variación (la desviación típica / duración media  $\times 100$ ) de los intervalos interespigas de cada tasa de disparo se representó frente a la intensidad de corriente. Estos datos se ajustaron a dos líneas de regresión, una para datos que mostraban una variabilidad baja y el otro cuando la variabilidad en el disparo fue alta. La corriente del umbral de reclutamiento fue aquella que producía un disparo con variabilidad baja y coincidía con el punto más cercano a la intersección de ambas líneas de regresión (punto de ruptura). La frecuencia mínima de disparo en el estado estable se asoció a la corriente del umbral de reclutamiento (para más detalles de la relación entre variabilidad en el disparo y umbral, ver Piotrkiewicz, 1999; Powers y Binder, 2000; González-Forero y col., 2002).



A



B



**Figura 4.3. Análisis de los registros electrofisiológicos de los experimentos de glutamato mediante el programa DIAdem. A,** imagen mostrando cómo se posicionan los cursores para cuantificar el voltaje de despolarización. **B,** imagen mostrando el análisis de la frecuencia de disparo tónica.

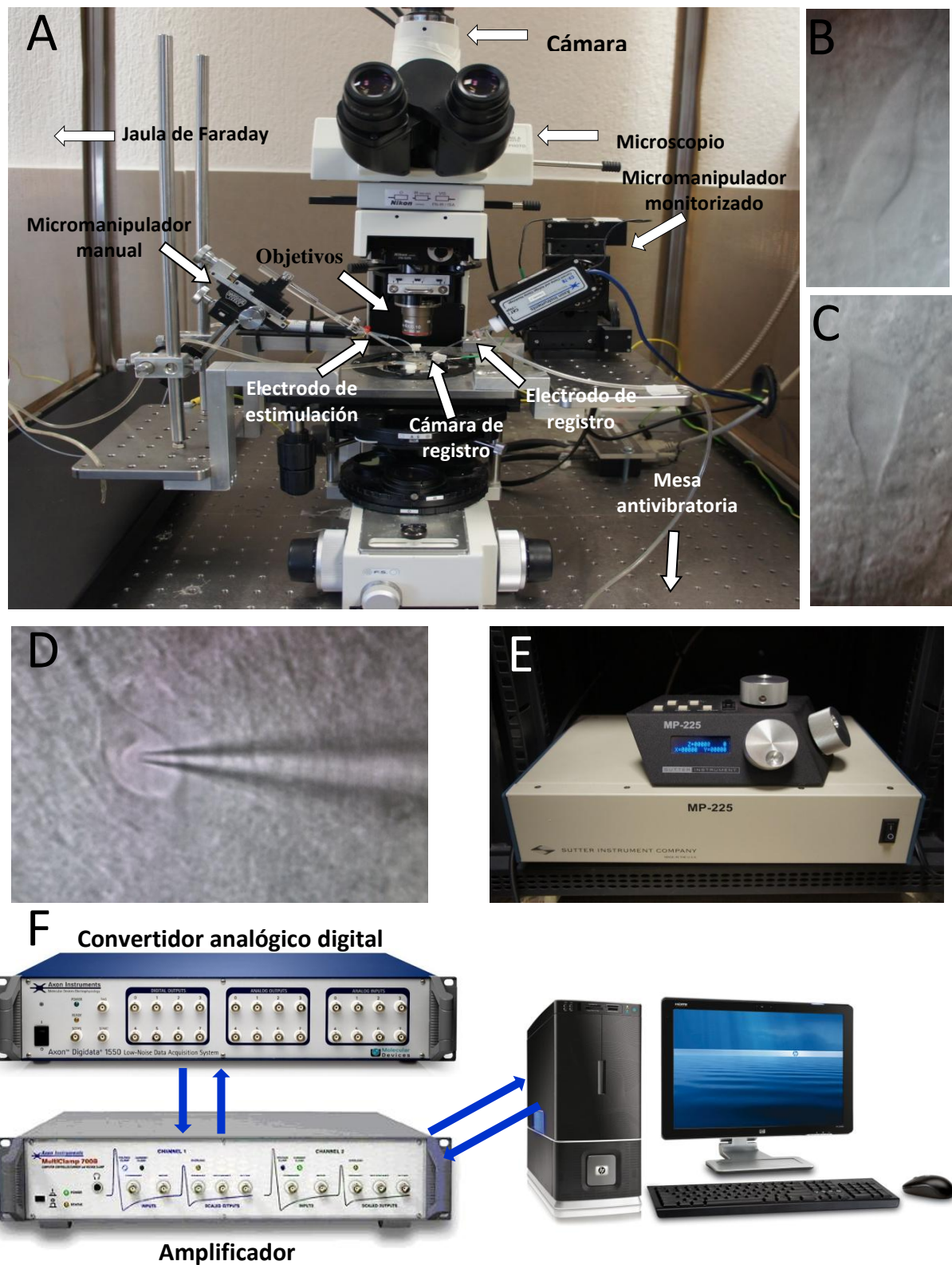
El componente fásico del disparo se calculó midiendo la frecuencia instantánea, que se correspondía con el recíproco de la duración del intervalo interespiga de los dos primeros potenciales de acción a la corriente que producía 20 espigas  $\cdot s^{-1}$  en la frecuencia tónica (una frecuencia en la que todas las motoneuronas mostraron un estado estable en su disparo). Por otro lado se midió también la adaptación del disparo repetitivo de acuerdo con el índice de adaptación (Sawczuk y col., 1995; Rekling y col., 2000), calculado como  $[1 - (\text{frecuencia en el estado estable} / \text{frecuencia instantánea en el primer intervalo interespiga})]$ . La adaptación calculada desde esta ecuación muestra valores entre 0 y 1; los valores 0 y 1 significan respuestas tónicas o fásicas puras respectivamente. El cambio en todos los parámetros estudiados se normalizaron y se midieron como el cociente entre el valor del parámetro en la condición glutamato / el valor en la condición control. Estos cambios fueron representados frente a la corriente del umbral de reclutamiento

#### **4.5. Registros electrofisiológicos de patch clamp en la configuración de whole cell en las condiciones control vs. GABA.**

En los registro de patch clamp, las motoneuronas fueron visualizadas usando un microscopio Nikon Eclipse FN1 equipado con una óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC), un objetivo de inmersión de 40x, y una cámara Hamamatsu C-7500 (figura 4.4A-C). Para los registros de fijación de corriente, las pipetas de patch (3-5 M $\Omega$ ) contenían una solución intracelular de gluconato de potasio (en mM): 120 K-gluconato, 10 KCl, 10 sal de fosfocreatina, 2 MgATP, 0,3 NaGTP, 0.1 EGTA [ethyleneglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid], 10 HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], ajustado a un pH de 7,3 con KOH. Para registros de fijación de voltaje, las pipetas de patch contenían una solución intracelular de cloruro de cesio (en mM): 140 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0,05 EGTA and 10 HEPES, ajustado a un pH de 7,3 con CsOH. La osmolaridad de ambas soluciones intracelulares fue de 280-290 mosmol/kg, ajustado con sacarosa.

**Figura 4.4. Técnica de patch clamp.** **A**, fotografía ilustrando los equipos necesarios para la visualización de las células y los accesorios de registro para patch clamp. **B**, **C**, imágenes representativas de dos motoneuronas del núcleo motor ocular común visualizadas mediante infrarrojo. **D**, imagen ilustrando la posición del microelectrodo sobre la célula a registrar. **E**, micromanipulador monitorizado utilizado para la aproximación del electrodo a la célula. **F**, fotografía ilustrando los equipos utilizados para el registro y almacenamiento de las señales electrofisiológicas.



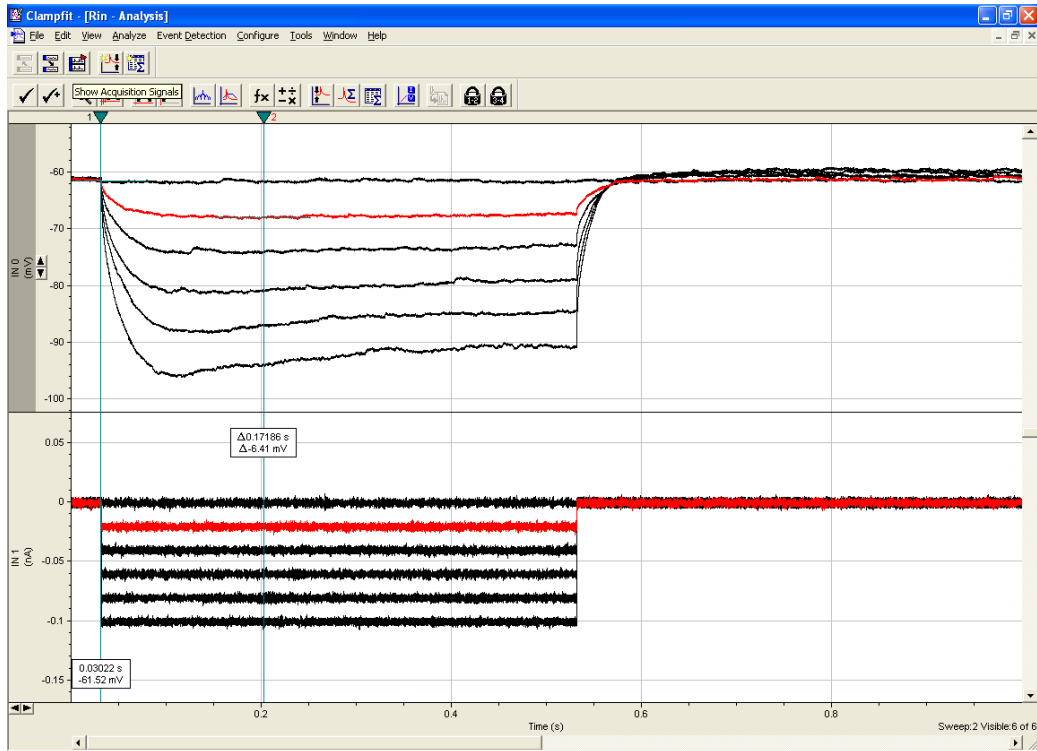


Los registros se realizaron en la configuración de whole-cell o célula completa. En esta configuración el interior de la pipeta queda en contacto directo con el citoplasma permitiendo estudiar la corriente que pasa a través de toda la membrana celular. El primer paso para la obtención de la citada configuración consiste en aproximar la punta de la pipeta a la superficie de la membrana (figura 4.4D). El movimiento del microelectrodo se realiza mediante un micromanipulador monitorizado (Sutter MP-225; figura 4.4E). Es conveniente que a la pipeta se le aplique una ligera presión positiva para evitar el intercambio iónico con la solución extracelular, y para evitar que se ensucie, lo que imposibilitaría la formación posterior del sello. A continuación, se suprime la presión positiva y se aspira levemente hasta que hay una adhesión perfecta entre el exterior de la pipeta y la membrana de la célula. Se dice entonces que se ha formado un sello de alta resistencia o giga-seal (denominado así porque la resistencia obtenida  $> 1$  gigaohm). En este momento nos encontramos en la configuración de cell-attached y es necesario aplicar una leve succión para conseguir que el sello se rompa y que el interior de la pipeta entre en contacto con el citoplasma. Estos registros se llevaron a cabo utilizando el amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices; figura 4.4F). Solo los registros con una resistencia de acceso entre 5 y 20 M $\Omega$  fueron aceptados para su posterior análisis. La resistencia en serie fue compensada al  $\sim 70\%$ . Los registros de corrientes y voltaje se pasaron por un filtro de baja frecuencia a 10 kHz, los datos fueron digitalizados a 20 kHz con un convertidor análogo – digital Digidata 1440A (figura 4.4F) y adquiridos usando el programa pCLAMP 10 (Molecular Devices). Los datos se almacenaron en el disco duro del ordenador (figura 4.4F) y fueron analizados posteriormente con el Clampfit 10.2 (Molecular Devices) software (figura 4.5).

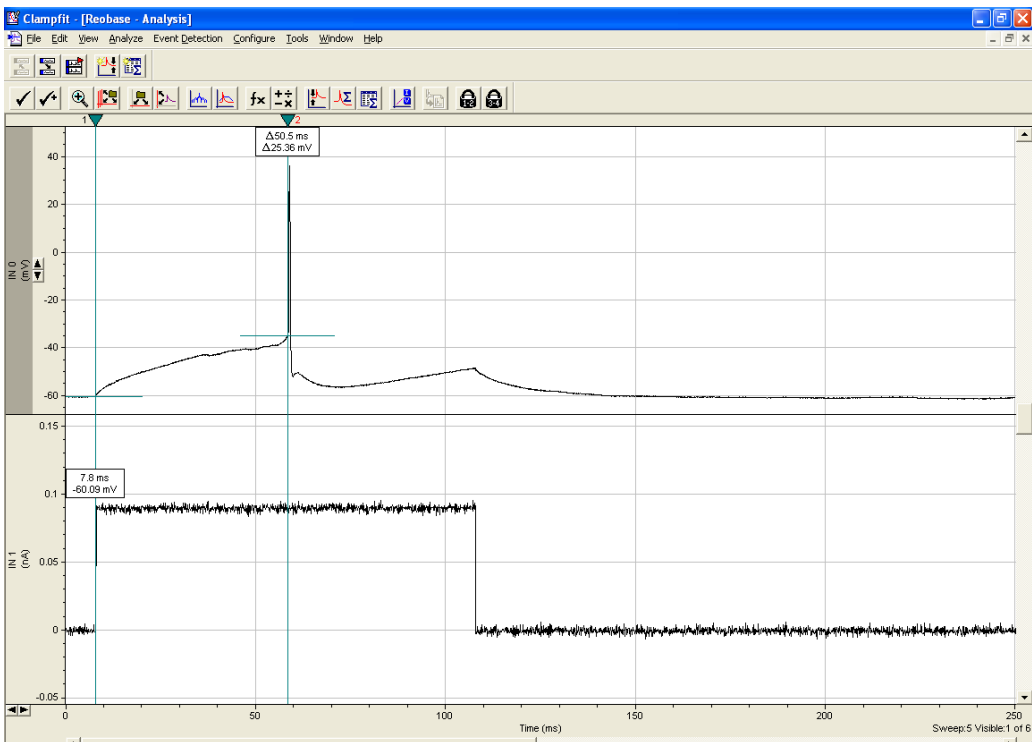
#### 4.5.1. Registros de fijación de voltaje y análisis.

La presencia y características de las corrientes inducidas por GABA se estudió mediante la configuración de fijación de voltaje. Durante estos experimentos, el potencial de membrana de las motoneuronas se fijó en -60 mV, y se usó una solución intracelular basada en CsCl para obtener  $E_{Cl^-} \sim 0$  mV. La intensidad de corriente producida por 100  $\mu$ M GABA se calculó como la diferencia entre el nivel de corriente control y aquel presente durante la exposición al GABA. La amplitud de la corriente tónica mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> se calculó como la diferencia entre el nivel de corriente control y el nivel de corriente tras la inyección de gabazina. La corriente fásica fue calculada multiplicando la transferencia neta de carga, medida como el área bajo el potencial postsináptico inhibitorio promedio, por la frecuencia sináptica (Nusser y Mody, 2002; Gao y Smith, 2010).

A



B



**Figura 4.5. Análisis de los registros electrofisiológicos de los experimentos de GABA mediante el programa pClamp. A,** imagen mostrando cómo se posicionan los cursores para cuantificar la resistencia de entrada. **B,** imagen mostrando el análisis de la reobase, voltaje de despolarización y voltaje umbral.

#### 4.5.2. Registros de fijación de corriente y análisis.

Los experimentos de fijación de corriente se realizaron con el objeto de estudiar el efecto de modulación de las corrientes inducidas por GABA sobre las propiedades intrínsecas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común. Este efecto de modulación se estudió tanto estimulando los receptores GABA por GABA 100  $\mu$ m como bloqueando los receptores GABA<sub>A</sub> mediante gabazina. Se cuantificaron los siguientes parámetros: potencial de membrana de reposo, resistencia de entrada, reobase (corriente umbral de reclutamiento), voltajes de despolarización y umbral, frecuencia tónica de disparo y la ganancia de la frecuencia de disparo. Todos estos parámetros se calcularon de la misma forma que en el apartado 4.4.2.

#### 4.6. Marcaje intracelular y reconstrucción.

Para determinar si las motoneuronas se reclutaban en función del principio del tamaño (Henneman y col., 1965; Mendell, 2005; véase sección 2.4), se registraron las motoneuronas y se marcaron intracelularmente mediante iontoforesis con neurobiotina al 1% (Neurobiotin tracer; Vector laboratories). Para ello se aplicaron pulsos de corriente de (400-500 pA) de 500 ms a 0,5 Hz durante 10–20 min. Tras la inyección, las rodajas se pasaron a una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%, en la que se mantuvieron durante toda la noche a 4°C. Tras este paso, la rodaja se incubó en tampón fosfato con 30% de sacarosa otra noche más. El marcaje con neurobiotina se reveló con el anticuerpo monoclonal anti-biotina fluoresceína isothiocyanato (FITC; 1:120; Sigma-Aldrich) y se visualizó mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2). Se tomaron fotomicrografías de los cuerpos celulares de las motoneuronas a diferentes profundidades y luego se usaron para reconstruir los somas celulares en 3D. Las reconstrucciones y la medida de superficie de membrana se realizaron con el programa Imaris (version 7.3). Posteriormente se representó, la relación existente entre la superficie celular y la resistencia de entrada para cada una de estas motoneuronas.

#### 4.7. Inmunohistoquímica del VGLUT y VGAT.

Para los estudios inmunohistoquímicos, en general, las ratas se perfundieron con tampón salino fosfato (PBS) seguido de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Tras la perfusión se extrajo el cerebro y se mantuvo en postfijación con PFA al 4% durante 2-3 h. Posteriormente, se pasó a una solución de sacarosa al 30% durante toda la noche. Tras esto, se obtuvieron con un criostato (Leica CM1850) cortes de cerebro de 40  $\mu$ m de grosor. Se realizó una doble inmunohistoquímica para determinar si las motoneuronas del núcleo motor ocular común recibían entradas glutamatérgicas y/o GABAérgicas. En ambos casos, se utilizó el anticuerpo primario frente a la

acetilcolintransferasa para identificar a las células como motoneuronas; el segundo anticuerpo primario utilizado fue el anti-transportador vesicular de glutamato (mezcla de VGLUT 1 y 2) para reconocer los terminales glutamatérgicos o el anti-transportador vesicular de GABA (VGAT) para visualizar los terminales sinápticos GABAérgicos. Los cortes seleccionados para la inmunohistoquímica se preincubaron en flotación en una solución de bloqueo (3% albumina sérica bovina) a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se incubaron en solución de bloqueo con ambos anticuerpos primarios, anti-ChAT (goat anti-ChAT affinity purified polyclonal antibody, 1:100; Millipore) y anti-VGLUT1,2 (guinea pig anti-VGLUT1 y anti-VGLUT2 polyclonal antibody; 1:5000 y 1:10000 respectivamente de Millipore) o anti-VGAT (rabbit polyclonal anti-VGAT, 1:500; Millipore). Finalmente se incubaron con ambos anticuerpos secundarios (Cy3-conjugated affiniPure donkey anti-goat para anti-ChAT y Cy5 Donkey antiguinea pig para anti-VGLUT1,2 o FITC-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG for VGAT; Jackson ImmunoResearch) se montaron con un medio para fluorescencia (Dako), y se observaron en el microscopio confocal Leica TCS SP2).

#### **4.8. Análisis estadístico.**

Las diferencias significativas entre los parámetros analizados en la situación control y en presencia de la droga se determinaron a través del test para muestras relacionadas de la T de Student. Las correlaciones entre variables se midieron a través del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). El nivel de significación se estableció cuando  $P < 0.05$ . Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar de la media.



## **5. RESULTADOS**



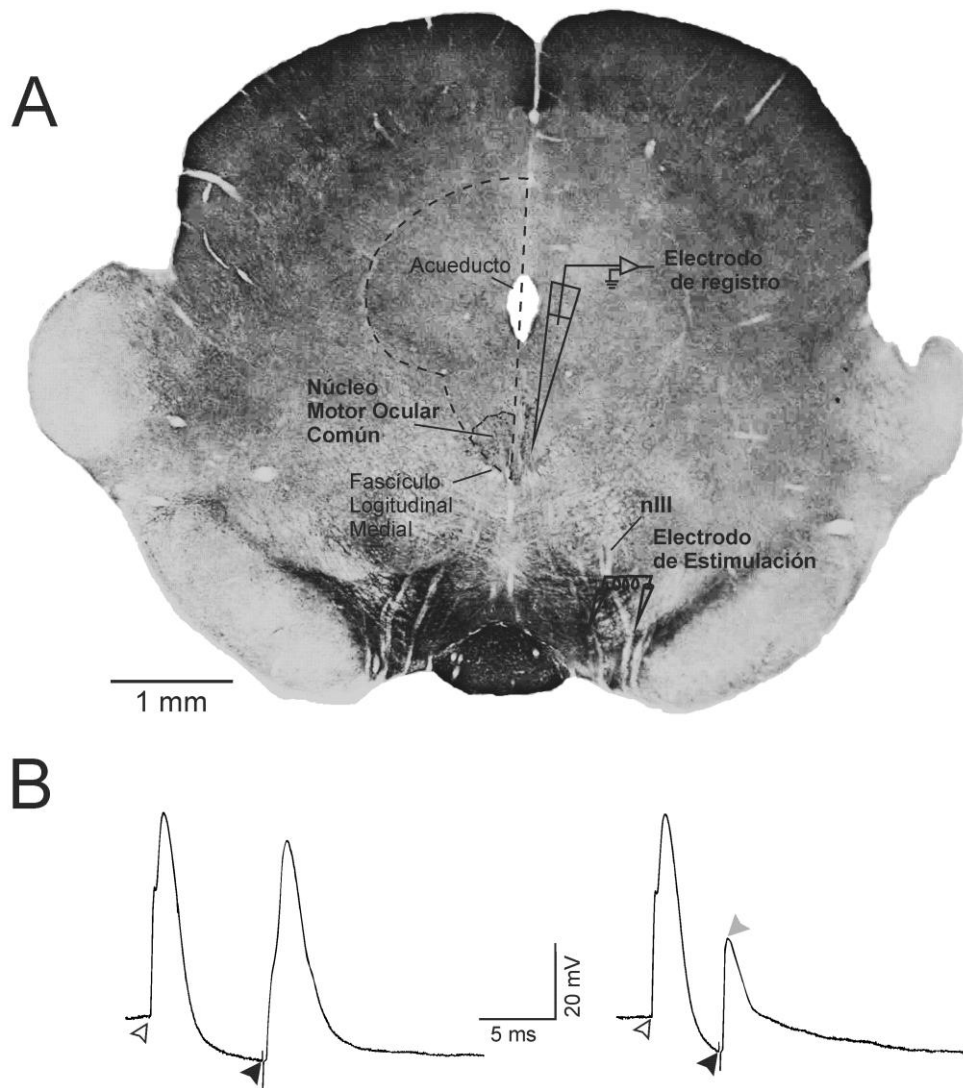


### 5.1. Identificación de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.

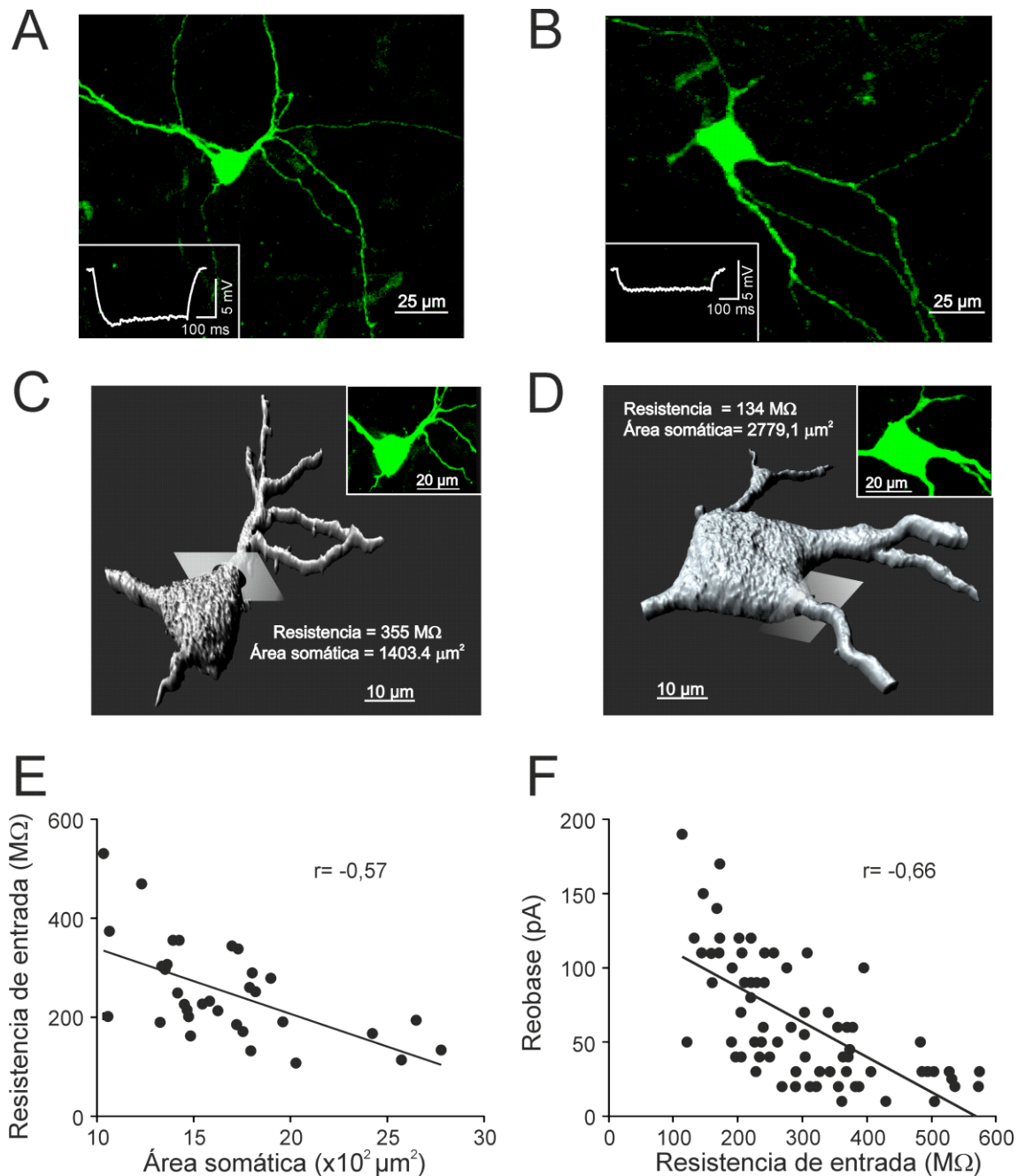
Las motoneuronas del núcleo motor ocular común se identificaron electrofisiológicamente por su activación antidrómica y el test de colisión (figura 5.1). El microelectrodo se posicionó dentro de los límites anatómicos del núcleo motor ocular común con la ayuda de una lupa binocular o del microscopio. El núcleo mostró un aspecto grisáceo, se localizó próximo a la línea media y debajo de la sustancia gris periacueductal. Para la identificación antidrómica de las motoneuronas se estimuló con pulsos eléctricos (duración, 100  $\mu$ s; intensidad,  $<100 \mu$ A; frecuencia 0,5 Hz) la raíz del nervio del tercer par craneal, el estímulo produjo un potencial de acción con una latencia corta ( $<1$  ms; figura 5.1A). El test de colisión determinó si la motoneurona registrada fue la misma que aquella que se activó desde la raíz del nervio (figura 5.1B). Para ello, se aplicó intracelularmente un pulso despolarizante (100  $\mu$ s) que produjo un potencial de acción. El potencial se utilizó como señal para generar un estímulo eléctrico aplicado a la raíz del nervio del tercer par craneal con latencias variables. Cuando el intervalo entre los dos estímulos fue  $>50$  ms, los potenciales de acción mostraron las mismas características. Intervalos más cortos produjeron la desaparición del componente somatodendrítico o la incapacidad para generar un segundo potencial de acción.

### 5.2. Principio del tamaño en las motoneuronas del núcleo motor ocular común.

De acuerdo con el principio de tamaño, el orden de reclutamiento de las motoneuronas se considera que depende de su resistencia de entrada, de tal manera que los motoneuronas más pequeñas con menos superficie tendrían mayor resistencia de entrada y producirían un cambio de potencial de membrana mayor que las motoneuronas más grandes en respuesta a la misma entrada de corriente sináptica (Henneman y col., 1965; Mendell, 2005). Para determinar si los efectos del GABA y glutamato sobre las propiedades intrínsecas de membrana dependen del tamaño celular, se estudió la relación entre la superficie somática y la resistencia de entrada, y entre la resistencia de entrada y la reobase. La figura 5.2A,B muestra dos ejemplos representativos de motoneuronas marcadas intracelularmente con neurobiotina y con diferentes resistencias de entrada (355 M $\Omega$  y 134 M $\Omega$ ). Las superficies somáticas para las motoneuronas mostradas en 5.2A,B fueron de 1403,4  $\mu$ m<sup>2</sup> y 2779,1  $\mu$ m<sup>2</sup> (figura 5.2C,D). En las motoneuronas marcadas (n = 33) se encontró una correlación inversa entre la superficie de membrana somática y la resistencia de entrada (figura 5.2E). Además, con el aumento de la resistencia de entrada de las motoneuronas se requirieron corrientes más bajas para ser reclutadas (reobase), también se encontró una buena relación lineal entre estos dos parámetros (n = 73; figura 5.2F).



**Figura 5.1. Identificación funcional de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.** **A.** Fotomicrografía de una sección transversal a nivel del núcleo motor ocular común, donde se ilustra la localización del electrodo de registro y del electrodo bipolar que producen la activación antidrómica. **B.** Test de colisión para comprobar que la neurona registrada dentro del núcleo motor ocular común es una motoneurona. Se utilizaron dos estímulos: el primero (flecha blanca) fue un pulso breve de corriente intracelular que produjo un potencial de acción y el segundo (flecha negra) fue un estímulo producido en el tercer par craneal (nIII). Cuando el intervalo entre pulsos fue largo se produjeron dos potenciales de acción de las mismas características, mientras que cuando este intervalo se acortó, fracasó el componente somatodendrítico en la activación antidrómica.

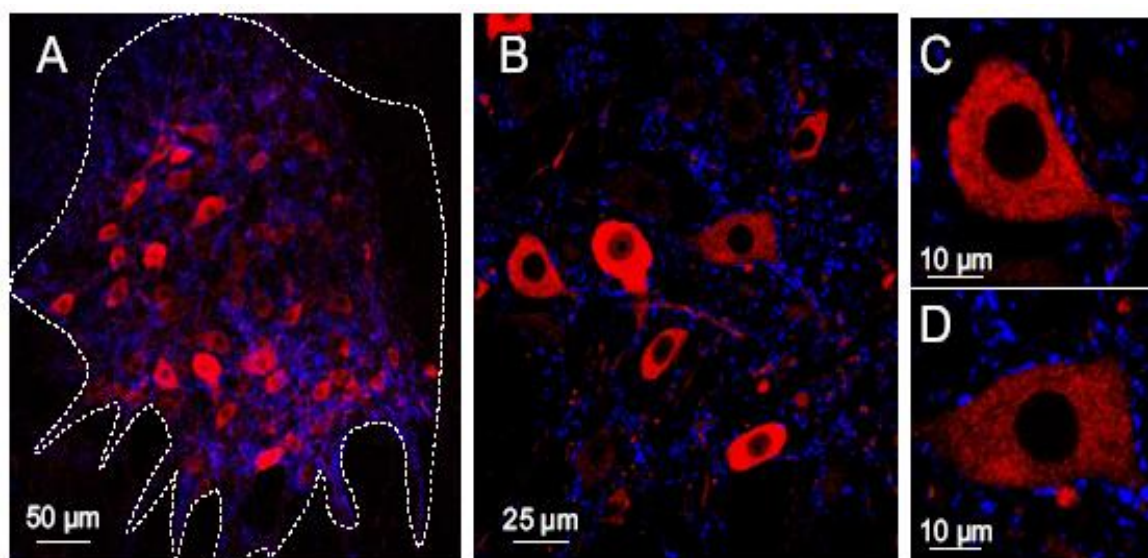


**Figura 5.2. Relación entre el tamaño de las células, la resistencia de entrada y la reobase de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** **A, B**, las fotomicrografías ilustran los cuerpos celulares y principales árboles dendríticos de dos motoneuronas con resistencias de entrada de 355 MΩ (**A**) y 134 MΩ (**B**). Los recuadros en **A, B** muestran las respuestas de los potenciales de membrana a pulsos de corriente negativa (20 pA) para las motoneuronas marcadas. **C, D**, reconstrucción tridimensional de las motoneuronas marcadas en **A** y **B**. Para obtener la superficie somática se utilizó el software Imaris y se separó por un plano el cuerpo celular de las dendritas principales (uno de estos planos se muestra para cada motoneurona). **E**, relación entre la superficie somática de membrana y la resistencia de entrada ( $n = 33$ ). **F**, relación entre la resistencia de entrada y la reobase ( $n = 73$ ). Se muestran los valores de correlación lineal.

### 5.3. Efectos del glutamato sobre la excitabilidad de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.

#### 5.3.1. Entradas sinápticas glutamatérgicas al núcleo motor ocular común: determinación inmunohistoquímica.

Aunque el glutamato se ha propuesto como el principal neurotransmisor excitador en las motoneuronas oculares (ver introducción), su presencia no ha sido descrita en ratas. Por ello, se estudió si las motoneuronas del núcleo motor ocular común mostraron terminales glutamatérgicos en etapas tempranas tras el nacimiento (figura 5.3A-C). Los terminales glutamatérgicos se identificaron por ser positivos al anticuerpo frente a los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT 1 y 2) en ratas ( $n = 3$ ) de 16, 18 y 19 días de edad. La observación de las preparaciones mostró una abundancia de terminales restringida a los límites anatómicos del núcleo (figura 5.3A), en particular, al neuropilo (figura 5.3B). El marcaje de terminales junto al soma de las motoneuronas (positivas frente al anticuerpo para acetilcolintransferasa) fue moderado, escaso (figura 5.3C,D) e incluso nulo (no ilustrado).



**Figura 5.3. Terminales glutamatérgicos en el núcleo motor ocular común de la rata.** A-D, tinción inmunohistoquímica del transportador vesicular de glutamato (VGLUT 1 y 2, azul) en los límites del núcleo motor ocular común de la rata (marcado por una línea discontinua), en el neuropilo (B) y junto al cuerpo celular de dos motoneuronas (identificadas por ser positivas al anticuerpo frente a la acetilcolintransferasa, marcadas en rojo, C,D).

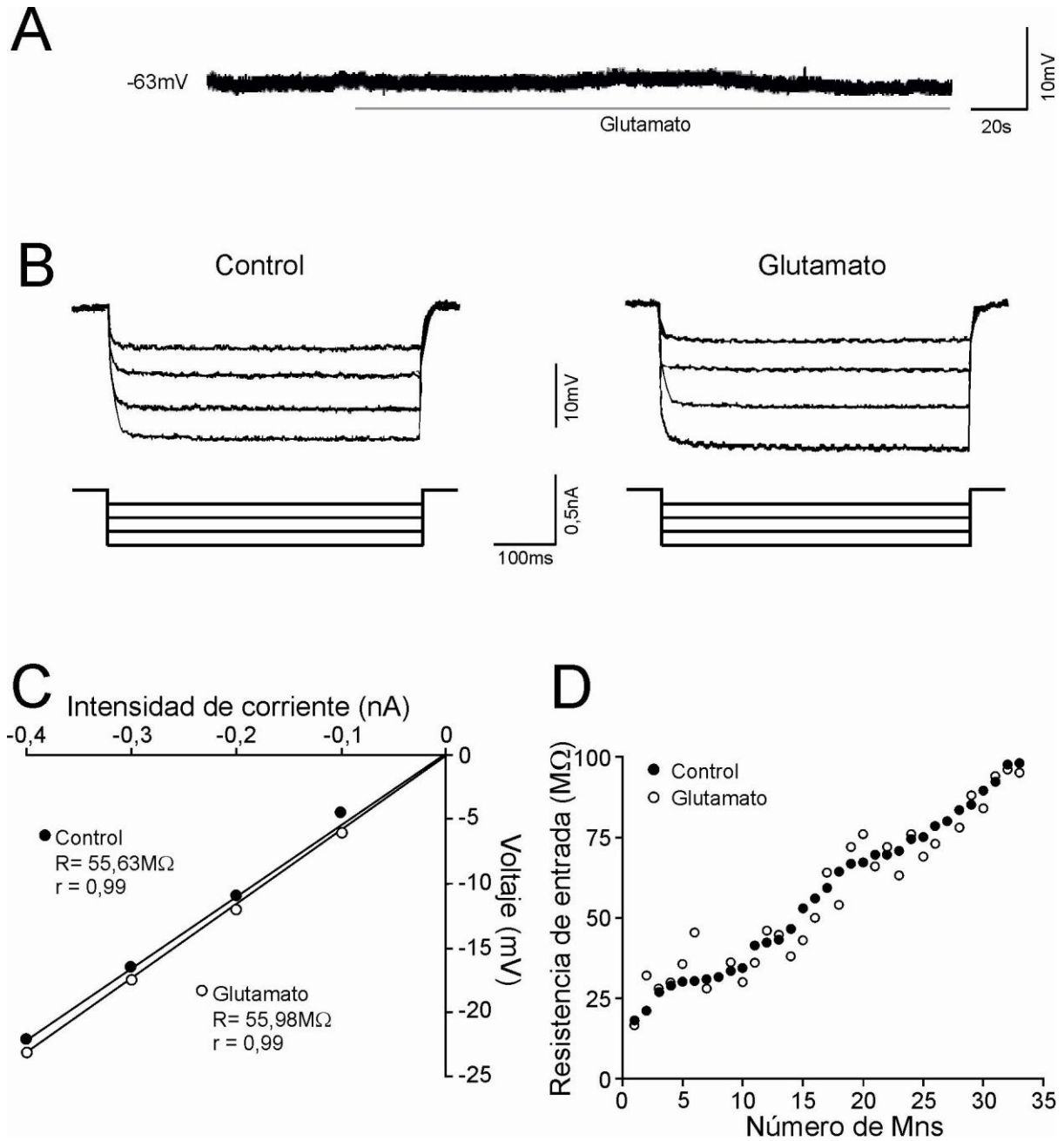
### 5.3.2. Efectos del glutamato sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada.

Las motoneuronas ( $n = 33$ ) del núcleo motor ocular común no generaron potenciales de acción cuando se registraron en su potencial de membrana de reposo y mostraron un disparo fásico-tónico cuando se les aplicó un pulso supraumbral de corriente despolarizante de larga duración (1 s). Los efectos electrofisiológicos del glutamato 5  $\mu\text{M}$ , que se describirán en los siguientes párrafos, revirtieron cuando las rodajas se lavaron con líquido cefalorraquídeo artificial durante 20 minutos. La perfusión con glutamato 5  $\mu\text{M}$  produjo, en algunas neuronas, una pequeña despolarización del potencial de membrana que no superó los 5 mV (figura 5.4A), aunque en el conjunto de la muestra estudiada no se encontraron cambios significativos en este parámetro (tabla 5.1). En respuesta a pulsos de corriente negativa de la misma intensidad, la motoneurona mostró hiperpolarizaciones de su potencial de membrana similares en las condiciones control y en presencia de glutamato (figura 5.4B). Cuando se representó la intensidad de corriente frente a los cambios en el potencial de membrana se obtuvo una relación lineal, la pendiente de esta relación se tomó como la resistencia de entrada (figura 5.4C). La resistencia de entrada no se modificó significativamente con la exposición a glutamato (figura 5.4D; tabla 5.1).

**Tabla 5.1. Efectos del glutamato (5  $\mu\text{M}$ ) sobre las propiedades intrínsecas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.**

Propiedades de Membrana	Control	Glutamato
Potencial de membrana (mV)	-61,3 $\pm$ 1,5	-66,1 $\pm$ 0,6
Resistencia de entrada ( $\text{M}\Omega$ )	57,3 $\pm$ 4,2	56,7 $\pm$ 4,0
Reobase (nA)	0,27 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,03*
Voltaje despolarización (mV)	16,25 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 1,3*
Ganancia de frecuencia tónica ( $\text{PA} \cdot \text{nA} \cdot \text{s}^{-1}$ )	29,28 $\pm$ 3,42	35,66 $\pm$ 4,87
Corriente de umbral de reclutamiento (nA)	0,35 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,01*
Frecuencia fásica (nA)	43,7 $\pm$ 3,9	58,1 $\pm$ 6,04*
Índice de adaptación	0,51 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,02*

Los asteriscos indican las diferencias significativas establecidas a un nivel de  $P < 0,05$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar.

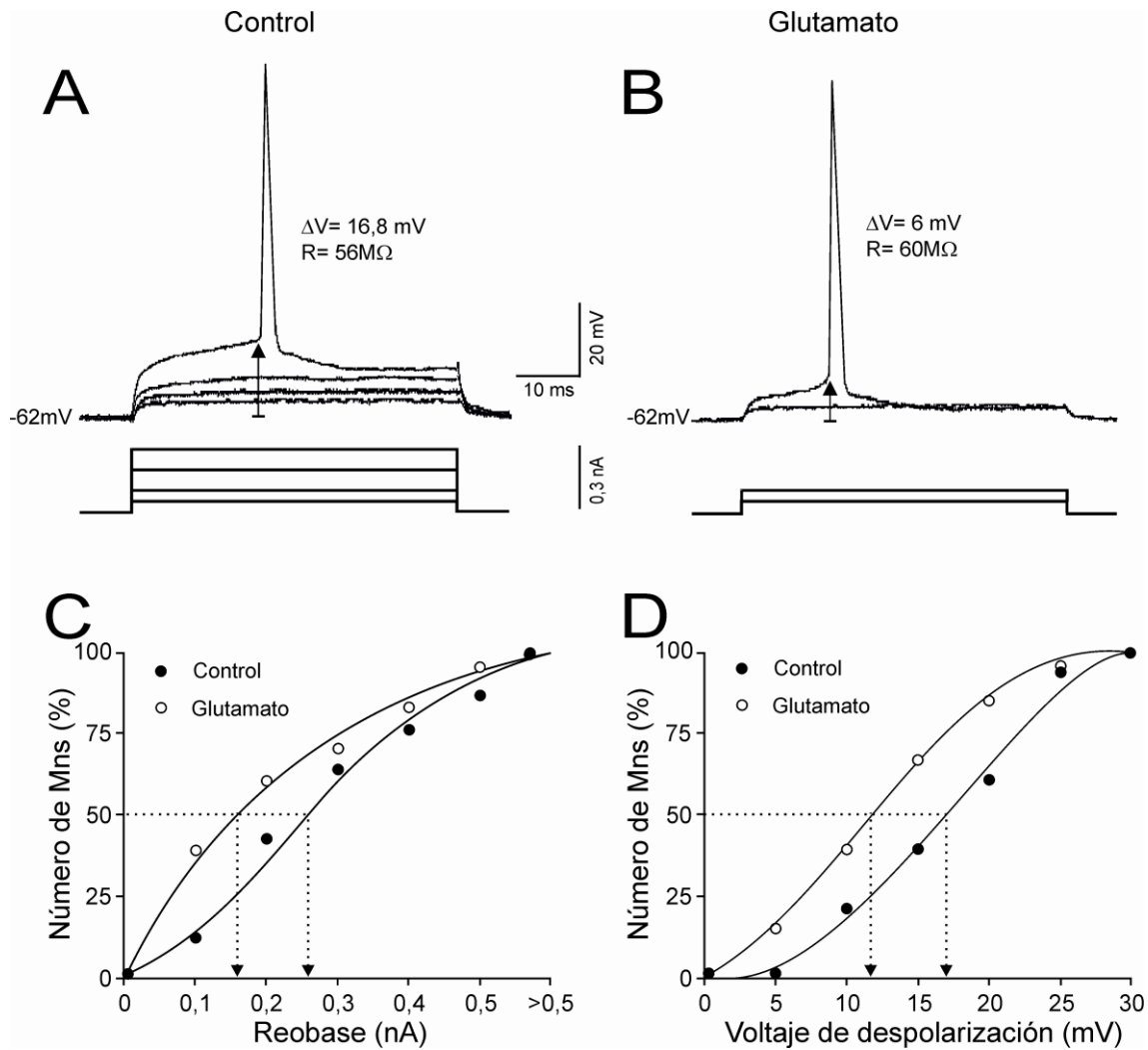


**Figura 5.4. Efectos del glutamato (5  $\mu$ M) sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** **A**, respuesta del potencial de membrana a la adición a la cámara de registro de glutamato. **B**, respuesta del potencial de membrana a pulsos de corriente hiperpolarizantes de igual intensidad en la condición control y en presencia de glutamato. **C**, representación de la relación corriente - voltaje para determinar la resistencia de entrada ( $R$ ) de la motoneurona mostrada en **B**. **D**, representación de los valores de resistencia de entrada de las motoneuronas estudiadas en las condiciones control y durante la exposición a glutamato.

### 5.3.3. Efectos del glutamato sobre la reobase y el voltaje despolarización.

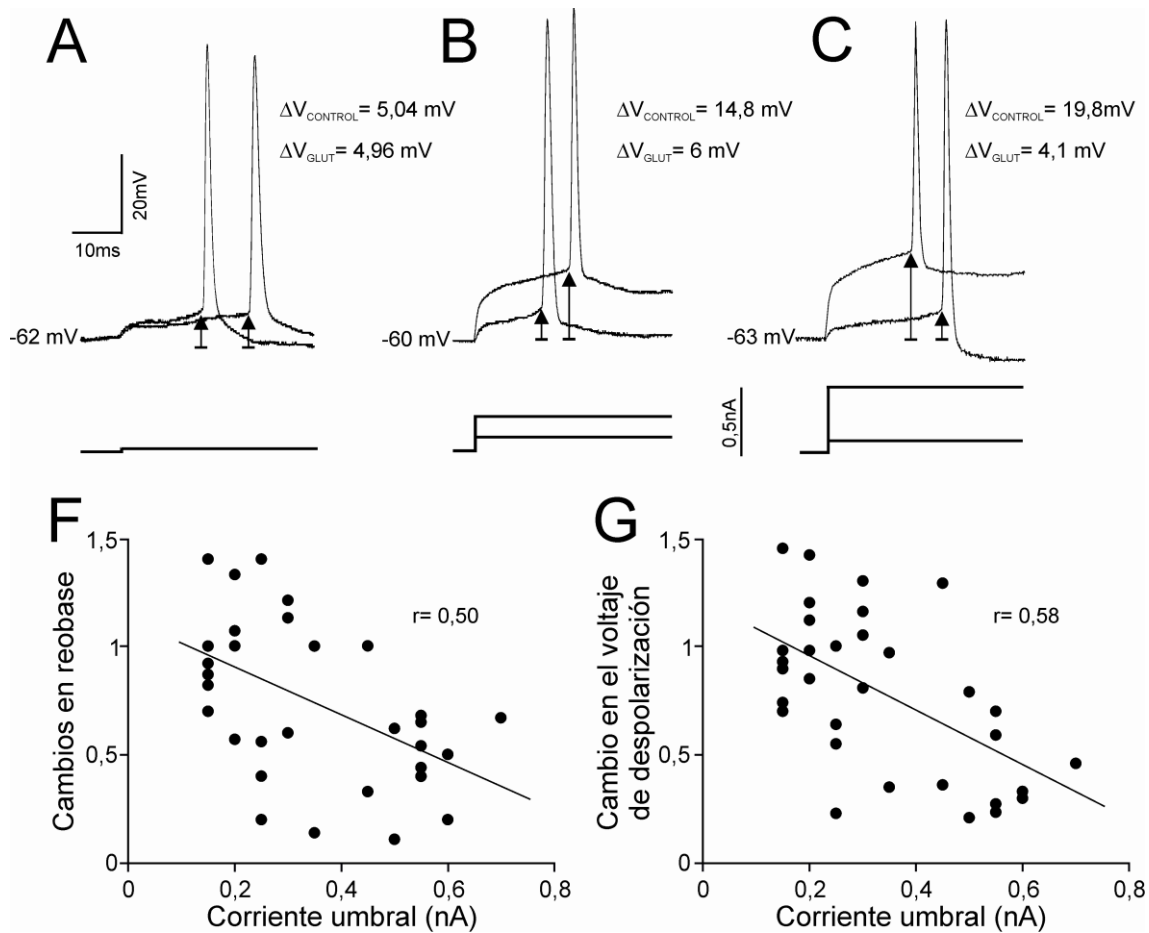
La exposición a glutamato 5  $\mu$ M de las motoneuronas disminuyó la reobase y el voltaje de despolarización (figura 5.5). La figura 5.5A,B ilustra un ejemplo representativo de una motoneurona en la condiciones control y durante la exposición a glutamato. La motoneurona mantuvo su potencial de membrana (-62 mV) y su resistencia de entrada (56 y 60 M $\Omega$ ), pero la reobase (0,3 vs. 0,1 nA) y el voltaje de despolarización (16,8 vs. 6 mV) disminuyeron en presencia de glutamato. La disminución en el voltaje de despolarización se produjo por una disminución del voltaje umbral (-45,2 vs. -56 mV). Estos hallazgos fueron semejantes a los obtenidos para el conjunto de las motoneuronas muestreadas (tabla 5.1). Aunque el glutamato produjo un escaso efecto sobre la resistencia de entrada o el potencial de membrana de reposo en el conjunto de la población, se estudió si los cambios en reobase y el voltaje de despolarización de cada motoneurona dependieron de los cambios en potencial de membrana y/o en resistencia de entrada. El análisis de estos datos mostró que los cambios en reobase y en el voltaje de despolarización (antes y durante la adición de glutamato a la cámara de registro) no se relacionaron con los cambios en el potencial de membrana, ni con los cambios en la resistencia de entrada (no ilustrado). Por otro lado, cuando la reobase y el voltaje de despolarización se representaron como diagramas acumulativos normalizados, se observó un desplazamiento a la izquierda de las dos variables por la exposición a glutamato (figura 5.5C,D). De acuerdo a estos gráficos, en la condición control el 50% de las motoneuronas produjeron un potencial de acción con valores de reobase  $\leq 0,26$  nA y con voltajes de despolarización  $\leq 17$  mV; mientras que en presencia de glutamato el 50% de las motoneuronas generó un potencial de acción con reobase  $\leq 0,16$  nA y con un voltaje de despolarización de  $\leq 12$  mV.

La figura 5.5 demuestra que la exposición a glutamato disminuyó los valores de reobase y voltaje de despolarización en las motoneuronas del núcleo motor ocular común. A continuación, se estudió si estos efectos dependieron del umbral de reclutamiento del disparo repetitivo. La figura 5.6A-C ilustra, en condiciones controles, tres motoneuronas con semejantes potenciales de membranas de reposo ( $\sim -62$  mV), diferentes umbrales de reclutamiento [bajo (A), medio (B) y alto (C)], reobases y voltajes de despolarización. La exposición a glutamato no modificó su potencial de membrana ni su resistencia de entrada, pero produjo una disminución en la reobase y en el voltaje de despolarización de las motoneuronas de umbral de reclutamiento medio y alto. Como se muestra en la figura, la disminución en la reobase y voltaje de despolarización fue mayor en la motoneurona de umbral más alto. Este resultado también se observó cuando se estudiaron las motoneuronas en conjunto ya que se encontró una relación de dependencia lineal entre los cambios de ambas variables y el umbral de reclutamiento para el disparo repetitivo (figura 5.6D,E).



**Figura 5.5. Efectos del glutamato sobre la rebase y el voltaje despolarización en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** A,B, registros que muestran la corriente mínima (rebase) y el voltaje de despolarización requeridos para producir un potencial de acción en la misma motoneurona en la condición control y en presencia de glutamato.  $\Delta V$  y  $R$  indican el voltaje de despolarización y la resistencia de entrada, respectivamente. C,D, diagrama acumulativo normalizado de rebase y voltaje de despolarización en la condición control y durante la exposición a glutamato. La línea discontinúa muestra los valores de rebase y voltaje de despolarización para los que el 50% de las motoneuronas produjeron un potencial de acción.



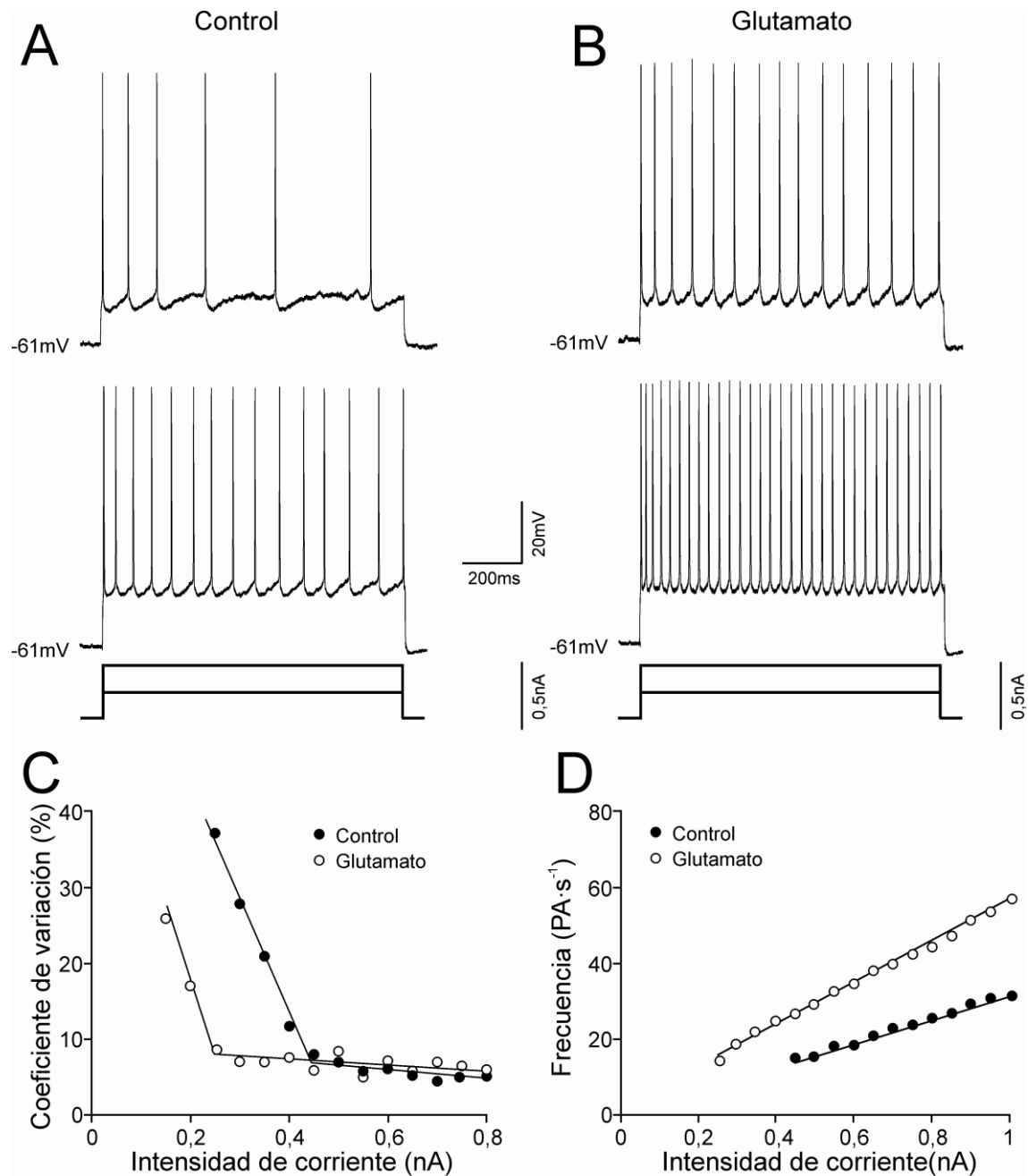


**Figura 5.6. Efectos del glutamato sobre la reobase y el voltaje de despolarización en función del umbral de reclutamiento del disparo repetitivo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** A–C, ejemplo de tres motoneuronas representativas con umbral de reclutamiento bajo (A), medio (B) y alto (C) registrado en condiciones control y durante la exposición a glutamato.  $\Delta V$  indica el voltaje de despolarización. D,E, representación de los cambios en reobase y voltaje de despolarización en función del umbral de reclutamiento.

#### 5.3.4. Efectos del glutamato sobre la frecuencia tónica de disparo.

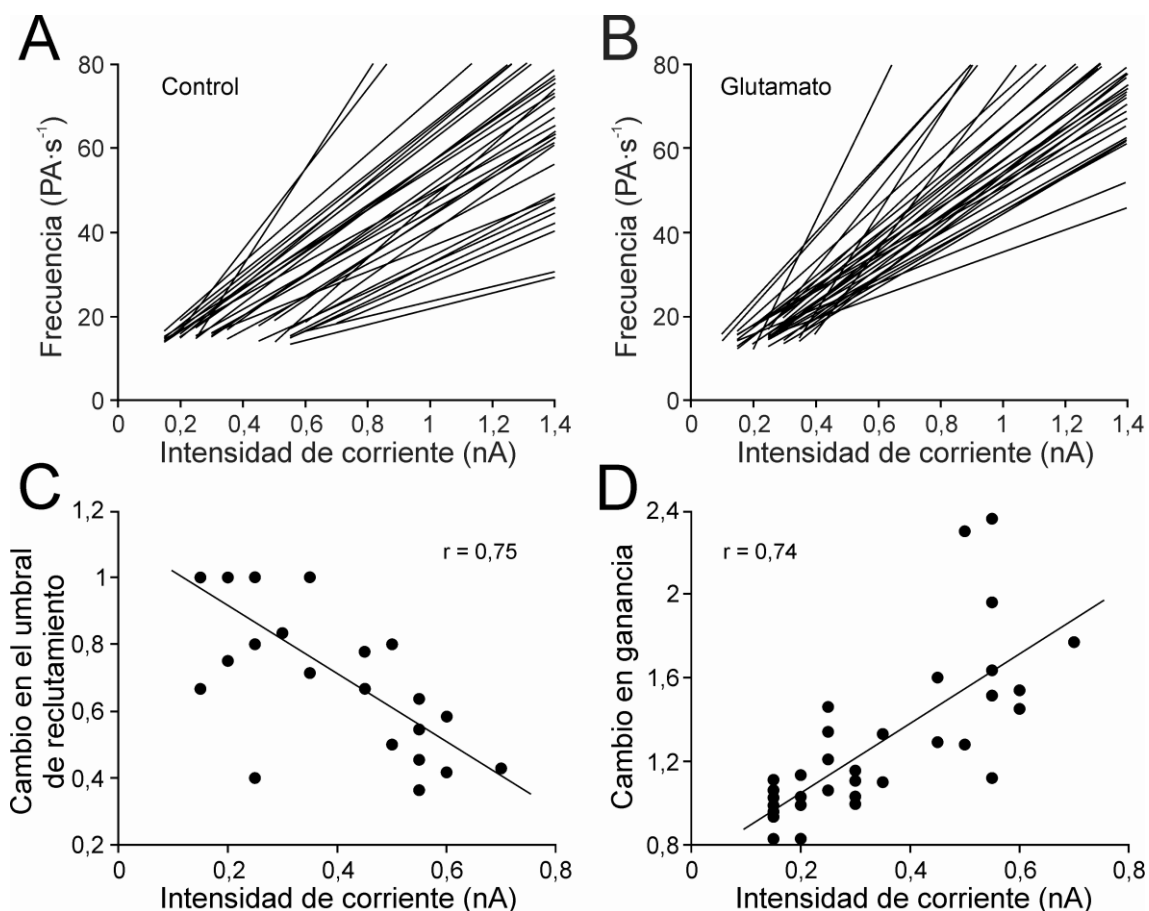
Las motoneuronas mostraron un patrón de disparo de potenciales de acción de tipo fásico-tónico en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes de 1 s. Se calculó el umbral de reclutamiento del disparo repetitivo y la frecuencia tónica para cada motoneurona en condición control y en presencia de glutamato. Como se muestra en la figura 5.7A,B, el número de potenciales de acción fue mayor cuando la motoneurona se expuso a glutamato. En respuesta a pulsos de corriente de 0,25 y 0,5 nA, la motoneurona generó una frecuencia de potenciales de acción (PA) de 4 y 14  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en la condición control, y de 14 y 30  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en presencia de glutamato. Para el ejemplo representativo de la figura 5.7C, el umbral de reclutamiento fue 0,45 y 0,25 nA y la frecuencia mínima de disparo estable fue de 15 y 14  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$  en la condición control y durante la exposición a glutamato. Todas las motoneuronas estudiadas mostraron una relación lineal ( $r = 0,99$ ) entre la frecuencia de disparo y la intensidad de corriente inyectada, tomando el valor de la pendiente de estas rectas como la ganancia de la frecuencia tónica de disparo. En la figura 5.7D se representa

la relación  $I$ - $F$  de la motoneurona mostrada en la figura 5.7A,B, pudiéndose observar que la exposición a glutamato produjo: i) un aumento de la ganancia de la frecuencia tónica; ii) un descenso en el umbral de reclutamiento; iii) una frecuencia de disparo tónica superior en todo el rango de estimulación.



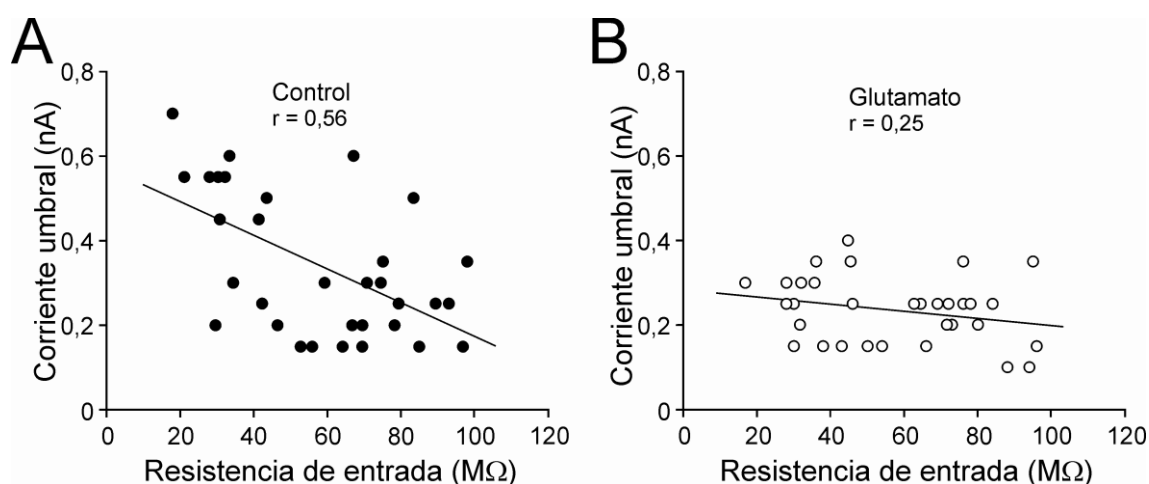
**Figura 5.7. Efecto del glutamato sobre la ganancia de la frecuencia tónica en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata. A,B,** disparo repetitivo de una motoneurona de umbral de reclutamiento alto en respuesta a dos pulsos de corriente en las condiciones control (A) y glutamato (B). **C,** relación entre el coeficiente de variación del intervalo entre potenciales de acción medido a diferentes frecuencias de disparo repetitivo e intensidades de corriente de estimulación. **D,** relación entre frecuencia de disparo en el estado estable y la intensidad de corriente (relación  $I$ - $F$ ) para una motoneurona en condiciones control y glutamato. Obsérvese que la motoneurona mostró un incremento en la ganancia de la frecuencia tónica y un descenso en el umbral de reclutamiento con la exposición a glutamato.

La figura 5.8A,B muestra las relaciones  $I$ - $F$  en las motoneuronas estudiadas. El rango de umbral de reclutamiento se distribuyó desde 0,15 a 0,7 nA ( $0,35 \pm 0,03$  nA) en control, y se comprimió entre 0,1 y 0,4 nA ( $0,24 \pm 0,01$  nA) cuando las motoneuronas se expusieron a glutamato. El umbral de reclutamiento disminuyó, pero esta disminución no afectó a todas las motoneuronas por igual. Los cambios en este parámetro se relacionaron linealmente con el umbral de reclutamiento control, siendo la disminución del umbral de mayor amplitud en las últimas motoneuronas en reclutarse (figura 5.8C). Las motoneuronas mostraron una ganancia de la frecuencia tónica que se distribuyó en un rango comprendido entre 17,3 y 98,6  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$  en la condición control y entre 26,6 y 132,3  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$  en presencia de glutamato. Para el conjunto de la población, se encontró un incremento significativo en este parámetro (tabla 5.1). El efecto del glutamato en la ganancia de la frecuencia tónica fue también diferente entre las motoneuronas. Así, los cambios en ganancia (ganancia en glutamato / ganancia en control) se distribuyeron en un rango de 0,8 a 2,4 e incrementaron linealmente con el reclutamiento (figura 5.8D). Esta covariación positiva indicó que las últimas motoneuronas en reclutarse fueron las más sensibles a la exposición a glutamato.



**Figura 5.8. Efectos del glutamato sobre la ganancia de la frecuencia tónica y el umbral de reclutamiento del disparo repetitivo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** A,B, relaciones  $I$ - $F$  para todas las motoneuronas registradas en las condiciones control (A) y glutamato (B). Nótese que el rango de umbral de reclutamiento fue más amplio en la condición control. C,D, relación entre el cambio en el umbral de reclutamiento (C) y el cambio en la ganancia de la frecuencia tónica (D) en función del umbral de reclutamiento del disparo repetitivo.

En la condición control se encontró una relación lineal entre el umbral de reclutamiento del disparo repetitivo y la resistencia de entrada (figura 5.9). Las motoneuronas con resistencias de entrada mayores, mostraron un umbral de reclutamiento de disparo repetitivo menor (de acuerdo al principio del tamaño). Sin embargo, no se encontró relación entre ambos parámetros cuando se añadió glutamato a la cámara de registro. La falta de relación se puede justificar por diferentes razones: i) la resistencia de entrada se mantuvo esencialmente inalterada con la adición de glutamato en todas las motoneuronas estudiadas; ii) las motoneuronas con umbral de reclutamiento bajo no modificaron su umbral comparado con la condición control; iii) las motoneuronas con umbral alto de reclutamiento mostraron un descenso en esta variable por el efecto del glutamato.

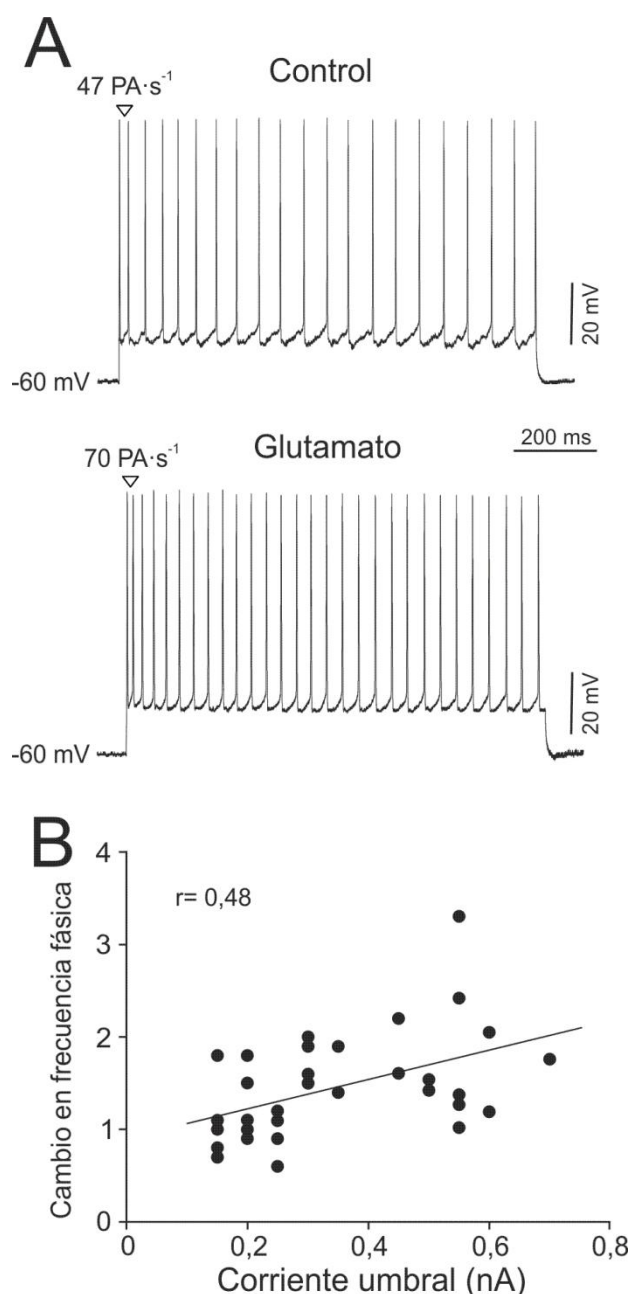


**Figura 5.9. Relación entre resistencia de entrada y umbral de reclutamiento en la condición control (A) y durante la exposición a glutamato (B) en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.**

### 5.3.5. Efecto del glutamato sobre el componente fásico del disparo repetitivo.

Con el objetivo de cuantificar el efecto del glutamato sobre el componente fásico del disparo repetitivo se calculó la frecuencia instantánea producida por pulsos de corriente que producían una frecuencia tónica de  $20 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$ . La frecuencia mayor se obtuvo en el primer intervalo interespiga tras el pulso de corriente y se consideró como valor de frecuencia fásica. Se observaron dos tipos respuestas: algunas motoneuronas mostraron una frecuencia fásica similar en control y glutamato, mientras que en otras motoneuronas la frecuencia fásica aumentó. La motoneurona representada en la figura 5.10A, alcanzó una frecuencia fásica de  $47 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en control y  $70 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$  cuando se expuso a glutamato. En la condición control, las motoneuronas mostraron una frecuencia fásica cuyo rango se distribuyó entre  $17,3$  y  $98,6 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $47,7 \pm 2,9 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$ ), mientras que en presencia de

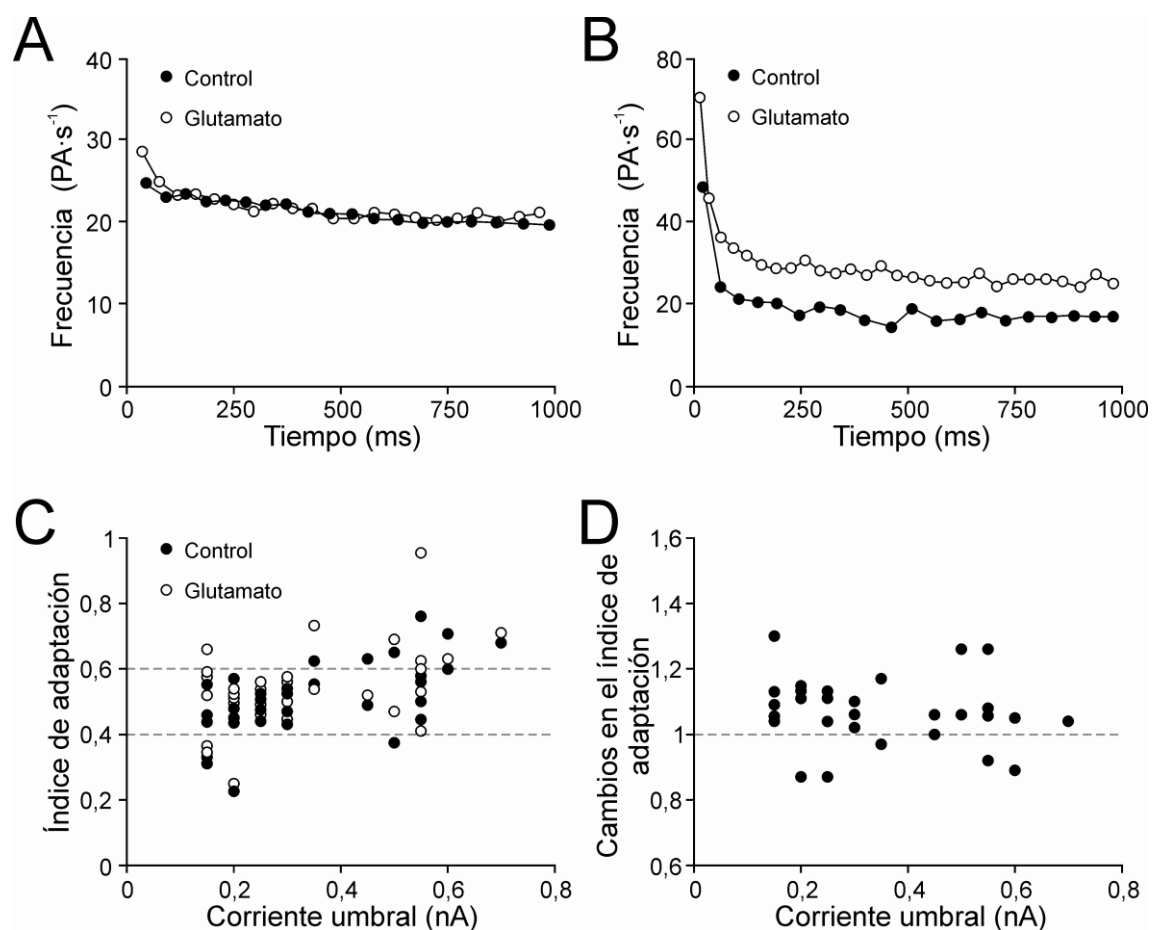
glutamato se distribuyó entre 26,6 y 132,3  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $58,4 \pm 3,5 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$ ). El cambio en la frecuencia fásica (frecuencia fásica en glutamato / frecuencia fásica en control) fue distinto entre las motoneuronas, y se distribuyó en un continuo que fue de 0,6 hasta 3,3. Se encontró una relación lineal positiva cuando se enfrentó el cambio en frecuencia fásica con el umbral de reclutamiento (figura 5.10B). Esta covariación positiva indicó que las últimas motoneuronas en reclutarse son aquellas cuya frecuencia fásica mostró un incremento más pronunciado en presencia de glutamato.



**Figura 5.10. Efecto del glutamato sobre la frecuencia fásica de disparo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** **A**, motoneurona representativa de umbral de reclutamiento alto registrada en la condición control y en presencia de glutamato. Obsérvese que el primer intervalo entre potenciales de acción fue el más corto y que la frecuencia fásica aumentó en presencia de glutamato. **B**, representación del cambio en la frecuencia fásica en función del umbral de reclutamiento.

### 5.3.6. Efectos del glutamato sobre el índice de adaptación de la frecuencia de disparo repetitivo.

Los resultados indicados demuestran que el glutamato modificó los componentes tónicos y fásicos del disparo repetitivo en función del umbral de reclutamiento. Se cuantificó el índice de adaptación para determinar si el efecto del glutamato fue similar en ambos componentes o, por el contrario, aumentó en mayor medida en alguno de ellos (figura 5.11). Cuando se representó el curso temporal de la frecuencia de disparo de las motoneuronas, se encontraron dos tipos de respuestas (figura 5.11A,B). En la figura 5.11A los componentes del disparo fásico y tónico de la motoneurona se mostraron prácticamente inalterados al comparar las condiciones control y glutamato, mientras que en la motoneurona representada en la figura 5.11B incrementó la frecuencia de disparo en los componentes fásico y tónico. La motoneurona de la figura 5.11A mostró una frecuencia fásica de 25 y 29  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  y una frecuencia tónica de 20 y 22  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$ . El glutamato no produjo modificaciones sobre el patrón de disparo. El índice de adaptación de esta motoneurona fue de 0,2 y 0,24 en las condiciones control y glutamato respectivamente. Las frecuencia fásica y tónica de la motoneurona ilustrada en la figura 5.11B fueron de 47  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  y de 20  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en la condición control; la exposición a glutamato incrementó ambos componentes, el fásico (70  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y el tónico (28  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$ ). El índice de adaptación de esta motoneurona fue de 0,57 y de 0,6 para las condiciones control y glutamato. La representación del índice de adaptación frente al umbral de reclutamiento en ambas condiciones (figura 5.11C) mostró: i) que en la mayoría de las motoneuronas (23/33) este índice se situó entre 0,6 y 0,4; ii) las motoneuronas (4/33) con un índice de adaptación por debajo de 0,4, es decir con un componente fásico pequeño, mostraron un umbral de reclutamiento  $\leq 0,2$  nA; iii) las motoneuronas (6/33) con un índice de adaptación por encima de 0,6 (con un componente fásico mayor) mostraron un umbral de reclutamiento  $\geq 0,35$  nA. Cuando se compararon los índices de adaptación de las motoneuronas en condiciones control y durante la exposición a glutamato se observó un incremento de toda la muestra (control =  $0,51 \pm 0,02$ ; glutamato =  $0,55 \pm 0,02$ ). De hecho, en la mayoría de las motoneuronas (26/33) el cambio en el índice de adaptación fue mayor que 1 (figura 5.11D). De estos datos se deduce que el glutamato aumentó el componente fásico más que el tónico. Estos cambios fueron independientes del umbral de reclutamiento (figura 5.11D).



**Figura 5.11. Efecto del glutamato sobre el índice de adaptación en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** **A,B**, frecuencia instantánea de una motoneurona de umbral de reclutamiento bajo (A) y una motoneurona de umbral de reclutamiento alto (B) en las condiciones control y glutamato. **C**, representación del índice de adaptación en función del umbral de reclutamiento en las condiciones control y glutamato. Nótese que la mayoría de las motoneuronas tienen un índice de adaptación entre 0,4 y 0,6 (línea gris). **D**, cambio en el índice de adaptación en función del umbral de reclutamiento.

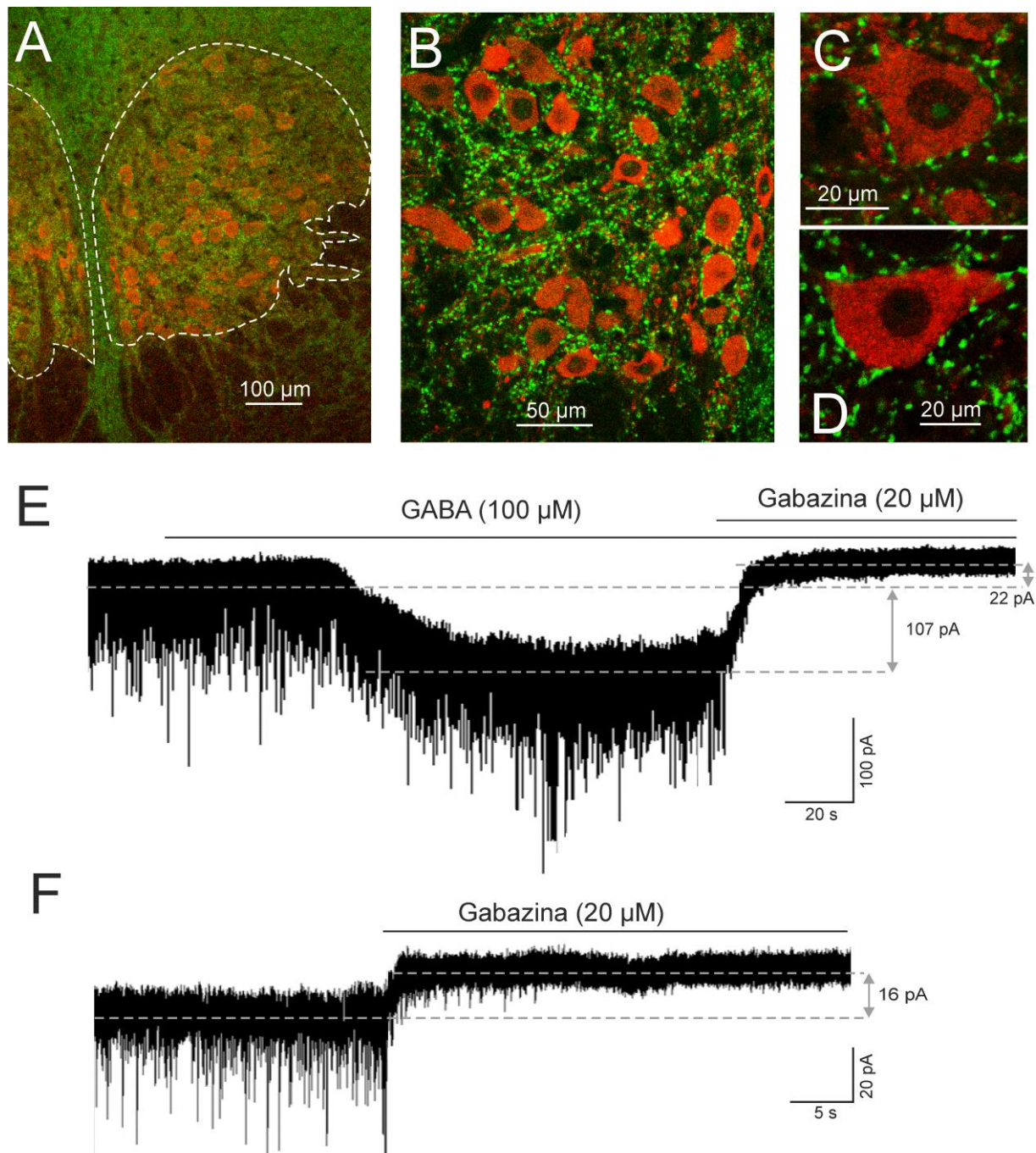
## 5.4. Efectos del GABA sobre la excitabilidad de la motoneuronas del núcleo motor ocular común.

### 5.4.1. Entradas sinápticas GABAérgicas y corrientes mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub>.

Aunque se ha descrito que el núcleo motor ocular común recibe abundantes entradas sinápticas GABAérgicas, esta proyección no ha sido descrita con anterioridad en este núcleo en la rata en su etapa postnatal. Por esta razón, se estudió la localización del transportador vesicular de GABA (VGAT) en tres animales con 15, 17 y 20 días de edad. La observación de las secciones transversales de cerebros en los tres casos reveló abundantes terminales sinápticas en el neuropilo del núcleo (figura 5.12A,B). Además, se observó un gran número de terminales teñidos adyacentes a los cuerpos celulares de las motoneuronas (figura 5.12C,D), que se identificaron por ser positivas para el anticuerpo contra acetilcolintransferasa (ChAT).

De acuerdo a las observaciones anatómicas, en todas las motoneuronas estudiadas ( $n = 8$ ) la adición de GABA a la cámara de registro produjo una corriente hacia el interior celular ( $129 \pm 23$  pA; figura 5.12E). Cuando se añadió al baño gabazina (antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>), se bloqueó la corriente. Este resultado demuestra que la corriente producida por la adición de GABA a la cámara de registro está mediada por receptores GABA<sub>A</sub>. Para determinar si las motoneuronas también presentan una corriente tónica dependiente de GABA, se añadió a la cámara de registro gabazina ( $20 \mu\text{M}$ ), en ausencia de GABA exógeno y en presencia de ácido quinurénico ( $2 \mu\text{M}$ ) para bloquear las corrientes glutamatérgicas ( $n = 8$ ). En estas condiciones, las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas se bloquearon, y se observó una corriente hacia fuera (figura 5.12F). Para cuantificar la contribución de las corrientes fásica y tónica, en el efecto producido por la gabazina en la función de entrada - salida de la motoneurona, se comparó la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas en relación a la corriente tónica. La frecuencia de corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias fue de  $2,7 \pm 0,61\text{Hz}$ , la transferencia de carga de las corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias fue de  $0,6 \pm 0,09$  PC, y la amplitud de la corriente fásica media fue de  $1,7 \pm 0,5$  pA. La amplitud de la corriente tónica media fue de  $9,2 \pm 1,5$  pA. Por lo tanto, la corriente tónica fue aproximadamente 5 veces mayor que la fásica [expresada de otra forma, la corriente tónica constituyó el 85 % de la corriente total (corriente total = corriente fásica + corriente tónica)]. Los efectos de GABA y gabazina desaparecieron cuando las rodajas de tejido se lavaron con líquido cefalorraquídeo artificial durante 20 minutos.





**Figura 5.12. Entradas sinápticas GABAérgicas y corrientes producidas por GABA en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** A-D, fotomicrografías que muestran el transportador vesicular de GABA (VGAT, verde) dentro de los límites del núcleo motor ocular común (delimitado por línea discontinua, A), en el neuropilo (B), y junto a los cuerpos celulares de motoneuronas (C,D). Las motoneuronas se identificaron por su inmunoreactividad positiva frente a la acetilcolintransferasa (rojo). E, corriente de entrada producida por la adición de GABA 100  $\mu\text{M}$ . Esta corriente (107 pA) dependió de los receptores GABA<sub>A</sub>, ya que se bloqueó por gabazina 20  $\mu\text{M}$ . F, la inyección de gabazina (20  $\mu\text{M}$ ) en la cámara de registro bloqueó las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas y reveló una corriente tónica de 16 pA en el caso de la motoneurona que se muestra. Esta corriente también se puede observar en el registro mostrado en la parte E de esta figura (22 pA).

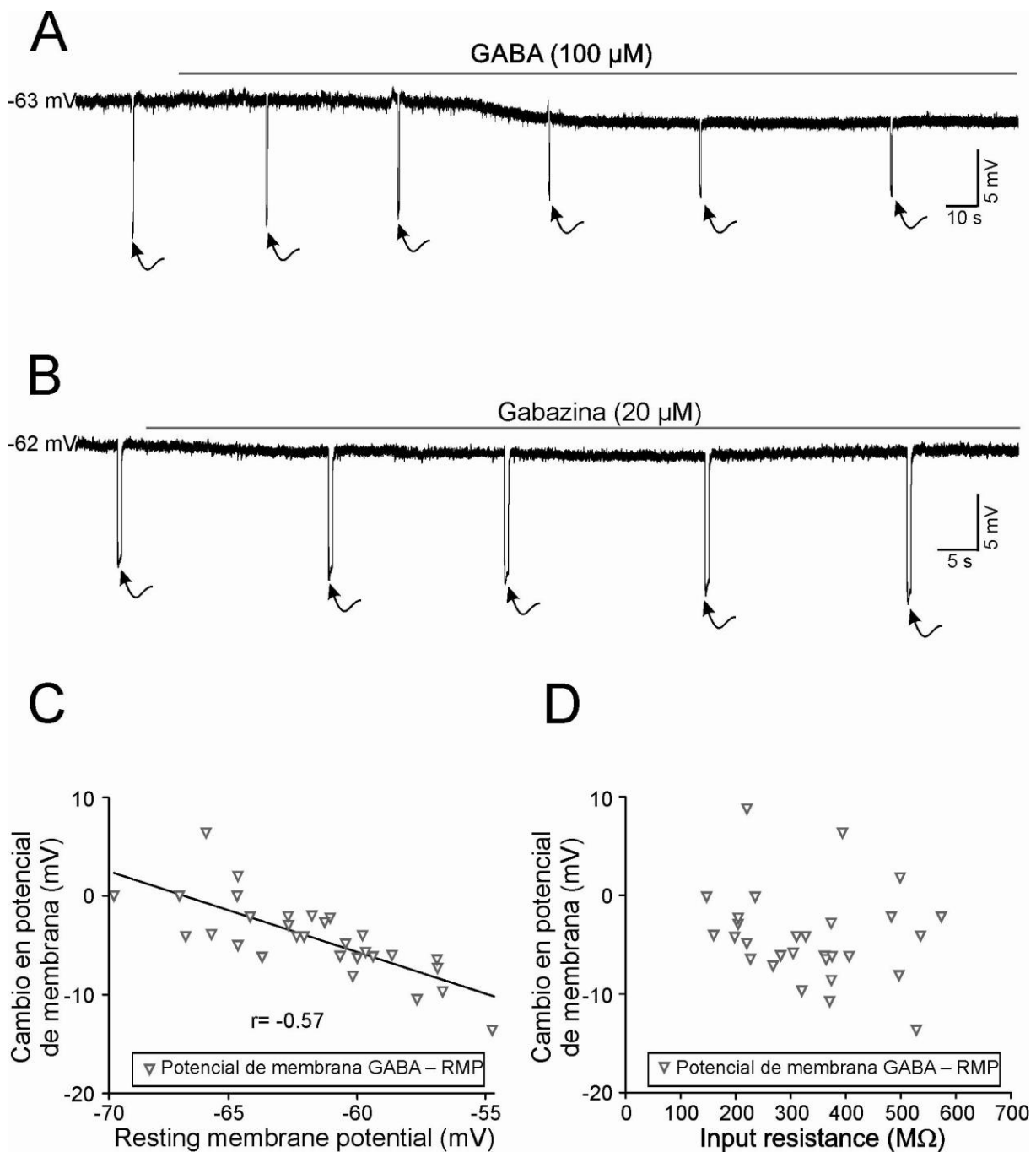
### 5.4.2. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada.

La hiperpolarización del potencial de membrana y el cambio en resistencia son los dos principales mecanismos que median la inhibición neuronal. La figura 5.13A,B ilustra los efectos del GABA y de la adición de gabazina a la cámara de registro sobre el potencial de membrana y la resistencia de entrada en dos motoneuronas representativas. La adición de GABA (100  $\mu$ M) produjo la hiperpolarización del potencial de membrana y una disminución del cambio del potencial de membrana en respuesta a pulsos de corriente de -50 pA (es decir, una disminución en la resistencia de entrada, ver las flechas en la figura 5.13A). La comparación de los valores de potencial de membrana mostró una diferencia significativa entre las condiciones control y GABA (tabla 5.2). El potencial de membrana de las motoneuronas expuestas a GABA alcanzó valores próximos a -67 mV, y cuanto más lejos se situó el potencial de membrana en reposo de -67 mV, mayor fue la amplitud del cambio de potencial (figura 5.13C). Por otro lado, el efecto del GABA sobre el potencial de membrana no se relacionó con la resistencia de entrada (figura 5.13D). A diferencia de los efectos producidos por GABA (100  $\mu$ M), la gabazina no modificó el potencial de membrana y aumentó la resistencia de entrada (figura 5.13B).

**Tabla 5.2. Efectos del GABA (100  $\mu$ M) y de la gabazina (20  $\mu$ M) sobre las propiedades intrínsecas de membrana de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.**

	GRUPO EXPERIMENTAL 1 (n=23)		GRUPO EXPERIMENTAL 2 (n=28)	
	Control	GABA	Control	Gabazina
Propiedades de membrana				
Potencial de membrana (mV)	-63,2 $\pm$ 0,7	-66,1 $\pm$ 0,6*	-61,5 $\pm$ 0,9	-60,9 $\pm$ 0,9
Resistencia de entrada (M $\Omega$ )	320,6 $\pm$ 27,6	209,9 $\pm$ 20,4*	284,5 $\pm$ 21,0	375,4 $\pm$ 21,1*
Constante de tiempo (ms)	24,2 $\pm$ 1,6	16,3 $\pm$ 1,4*	20,1 $\pm$ 0,9	26,5 $\pm$ 0,8*
Reobase (pA)	59,3 $\pm$ 7,9	129,8 $\pm$ 12,4*	67,8 $\pm$ 8,9	52,1 $\pm$ 6,3*
Voltaje umbral (mV)	-39,1 $\pm$ 1,2	-38,5 $\pm$ 1,7	-37,7 $\pm$ 1,08	-36,4 $\pm$ 1,3
Ganancia (PA $\cdot$ nA $\cdot$ s <sup>-1</sup> )	187,5 $\pm$ 25,9	161,8 $\pm$ 18,2	197,4 $\pm$ 15,0	175,3 $\pm$ 18,3

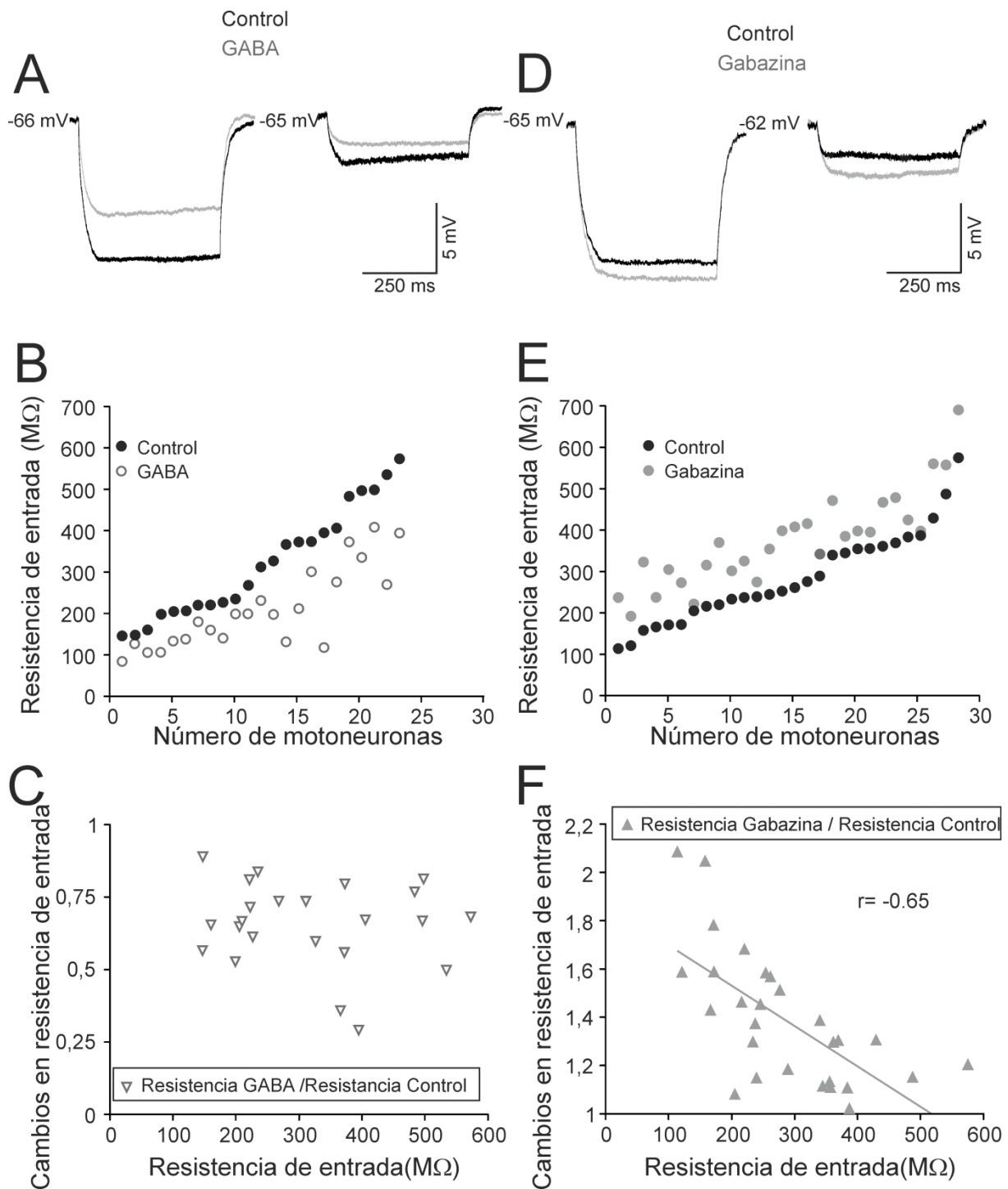
Los asteriscos indican las diferencias significativas establecidas a un nivel de P<0,05. Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar.



**Figura 5.13. Efectos del GABA (100  $\mu$ M) y de la gabazina (20  $\mu$ M) sobre el potencial membrana y la resistencia entrada de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** **A**, la adición a la cámara de registro de GABA 100  $\mu$ M produjo una hiperpolarización del potencial de membrana de reposo y una disminución en la respuesta del potencial de membrana (ver flechas) a pulsos de corriente negativa de 50 pA. **B**, la gabazina produjo un aumento en la respuesta del potencial membrana (ver flechas) a pulsos de corriente negativa de 50 pA, mientras que el potencial de membrana de reposo permaneció inalterado. **C**, relación entre el potencial de membrana de reposo y el cambio en el potencial de membrana producido GABA 100  $\mu$ M. Obsérvese que el cambio del potencial de membrana disminuye cuando los valores de reposo se aproximaron a -67 mV. **D**, relación entre la resistencia de entrada y el cambio en el potencial de membrana producido por GABA 100  $\mu$ M.

Una concentración alta de GABA produjo una disminución significativa en la resistencia de entrada de las motoneuronas ( $n = 23$ , tabla 5.2). La figura 5.14A ilustra el efecto del GABA ( $100 \mu\text{M}$ ) en dos motoneuronas representativas con resistencias de entrada alta y baja, en la condición control. La disminución de la resistencia de entrada fue más pronunciada en la motoneurona de resistencia de entrada alta ( $496,5$  vs.  $335,4 \text{ M}\Omega$ ) que en la motoneurona con resistencia de entrada baja ( $160,2$  vs.  $105,8 \text{ M}\Omega$ ) en respuesta a un pulso de corriente negativo de la misma intensidad ( $20 \text{ pA}$ ). Sin embargo, el cambio relativo (resistencia de entrada en presencia GABA / resistencia de entrada en condición de control) fue similar en ambas motoneuronas ( $\sim 35 \%$ ). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para el conjunto de la muestra (figura 5.14B). Las resistencias de entrada se distribuyeron en un rango entre  $146$  y  $573,5 \text{ M}\Omega$  en la condición de control, y entre  $84$  y  $408,4 \text{ M}\Omega$  con GABA ( $100 \mu\text{M}$ ). Estos resultados muestran que en las motoneuronas con resistencia de entrada alta, es decir, con pequeño tamaño, el GABA produjo una disminución más pronunciada en valores absolutos. Este efecto desapareció cuando se normalizaron los datos (resistencia de entrada en presencia de GABA / resistencia de entrada control) y se representaron en función de la resistencia de entrada en control (figura 5.14C).

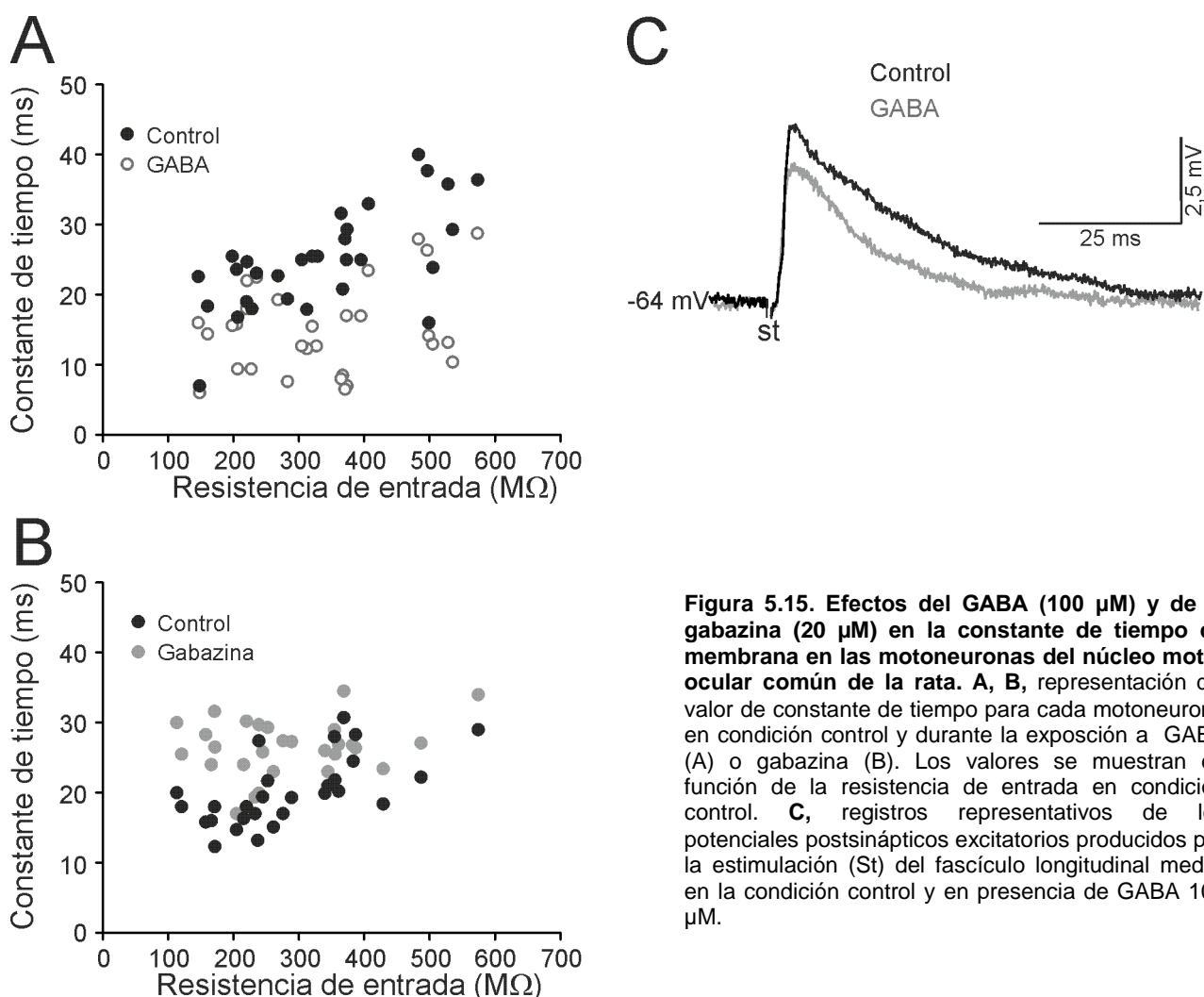
El bloqueo de los receptores  $\text{GABA}_A$  con gabazina produjo un aumento significativo en la resistencia de entrada de las motoneuronas ( $n = 28$ , Tabla 5.2). La figura 5.14D muestra los cambios de voltaje en respuesta a pulsos de corriente de igual intensidad ( $20 \text{ pA}$ ) en una motoneurona con alta y otra con baja resistencia, en la condición control y en presencia de gabazina. El aumento de la resistencia de entrada fue similar en la motoneurona con resistencia alta ( $487,3$  vs.  $557,8 \text{ M}\Omega$ ) y baja ( $121,1$  vs.  $192,1 \text{ M}\Omega$ ). Sin embargo, el cambio relativo (resistencia en presencia de resistencia gabazina / resistencia control) fue mayor en la motoneurona con menor resistencia de entrada. La observación de los datos (figura 4.13E) muestra que la gabazina produjo cambios en la resistencia de entrada cuyos valores absolutos no variaron notablemente entre las motoneuronas. Las resistencias se distribuyeron entre  $113,9$  y  $574,9 \text{ M}\Omega$  para la condición control, y entre  $192,1$  y  $690,4 \text{ M}\Omega$  en presencia de gabazina. Cuando se estudió la relación entre la resistencia de entrada control y el cambio de resistencia de entrada normalizado se obtuvo una relación lineal inversa (figura 4.14F). Así, la resistencia de las motoneuronas que se reclutan primero, es decir, las que tienen una resistencia de entrada alta y pequeño tamaño, apenas se afectan por la gabazina, mientras que las últimas motoneuronas en reclutarse duplicaron los valores de la resistencia de entrada.



**Figura 5.14. Efectos del GABA (100  $\mu$ M) y de la gabazina (20  $\mu$ M) sobre la resistencia de entrada de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata. A, D, respuestas del potencial de membrana a pulsos de corriente negativos de 20 pA. Los registros se realizaron en motoneuronas de resistencia de entrada baja y alta, en condiciones control vs. GABA (A) y en condición control vs. gabazina (D). B, E, gráficos que muestran los valores de la resistencia de entrada de cada motoneurona en la condición control y durante la exposición a GABA (B) o gabazina (E). C, F, relación entre la resistencia de entrada en la condición control y el cambio de la resistencia de entrada producido por la exposición a GABA (C) o a gabazina (F). Obsérvese que la resistencia de entrada cambió linealmente con la resistencia de entrada en presencia de gabazina, mientras que fueron independientes en presencia de GABA 100  $\mu$ M.**

### 5.4.3. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> sobre la constante de tiempo.

Una concentración alta de GABA en el medio y el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> por gabazina también produjeron cambios en la constante de tiempo de membrana. La modificación de este parámetro podría alterar la ventana de tiempo durante el cual se produce la integración sináptica (Semyanov et al., 2004). La perfusión con GABA 100  $\mu$ M disminuyó significativamente la constante de tiempo de membrana (tabla 5.2), y la amplitud de este cambio fue más pronunciado en las motoneuronas de resistencia de entrada alta (figura 5.15A). Por el contrario, la gabazina aumentó significativamente la constante de tiempo de la membrana y este cambio fue más notable en las motoneuronas con resistencia de entrada baja (figura 5.15B). Para determinar el efecto del GABA y de la gabazina sobre los potenciales postsinápticos, se estimuló el fascículo longitudinal medial ( $n = 6$ ). La figura 5.15C muestra que la amplitud y la constante de tiempo de los potenciales postsinápticos excitatorios disminuyeron con la aplicación de GABA, mientras que aumentaron en presencia de gabazina (no ilustrado).



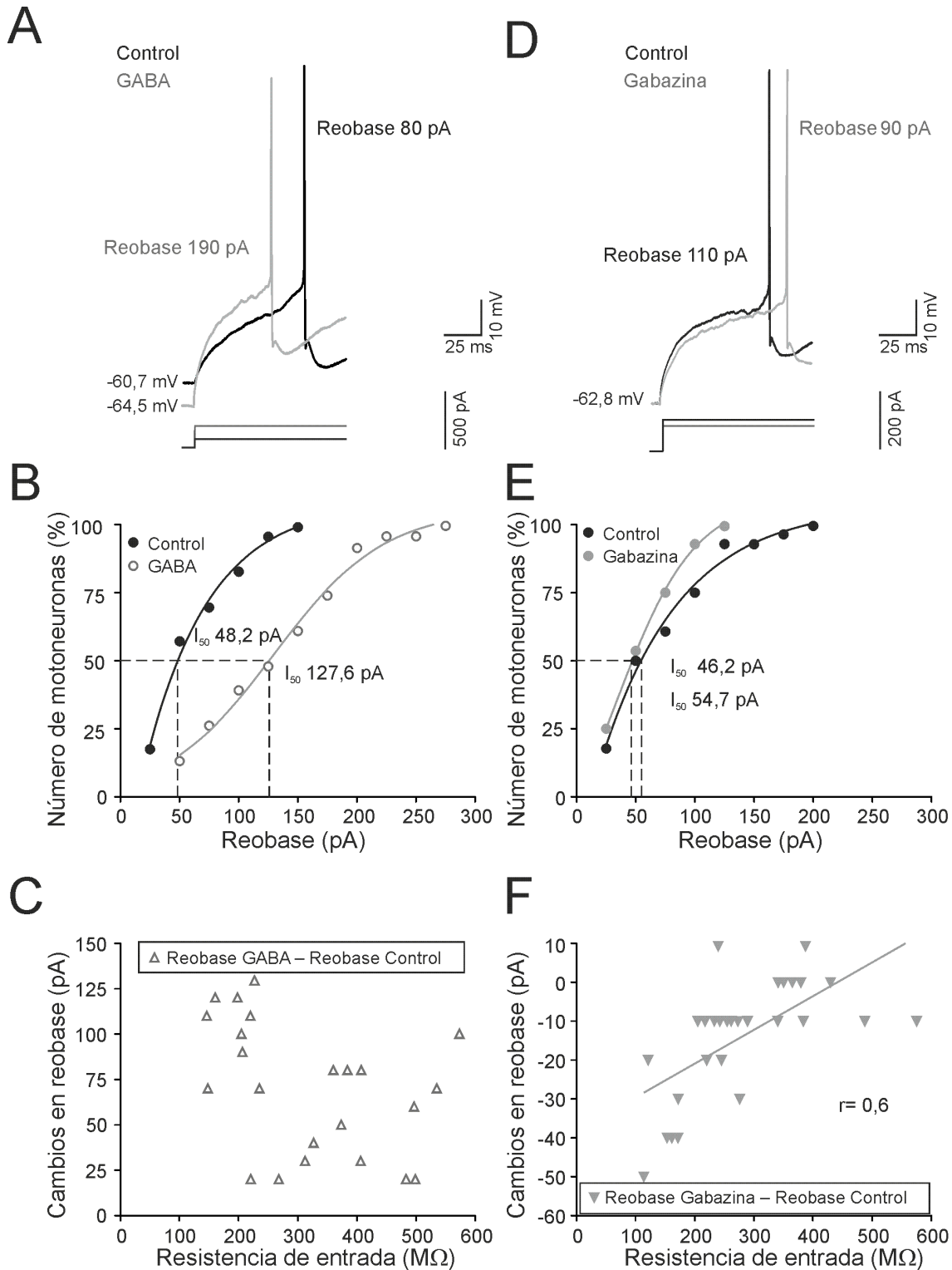
**Figura 5.15. Efectos del GABA (100  $\mu$ M) y de la gabazina (20  $\mu$ M) en la constante de tiempo de membrana en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata. A, B, representación del valor de constante de tiempo para cada motoneurona en condición control y durante la exposición a GABA (A) o gabazina (B). Los valores se muestran en función de la resistencia de entrada en condición control. C, registros representativos de los potenciales postsinápticos excitatorios producidos por la estimulación (St) del fascículo longitudinal medial en la condición control y en presencia de GABA 100  $\mu$ M.**

#### 5.4.4. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> sobre el umbral de reclutamiento.

Para determinar si los cambios producidos en las propiedades pasivas de la membrana por la exposición a GABA o a gabazina fueron suficientes para modificar la corriente umbral de reclutamiento del potencial de acción, se estudió primero los efectos de estos fármacos sobre la corriente mínima requerida para generar un potencial de acción (reobase) y sobre el potencial umbral de disparo del potencial de acción (voltaje umbral). La adición de GABA 100  $\mu$ M a la cámara de registro produjo un aumento significativo de la reobase sin causar cambio en el voltaje umbral (figura 5.16; tabla 5.2). Cuando los datos se representaron en diagramas acumulativos normalizados, se observó un desplazamiento hacia la derecha en la reobase (figura 5.16B). De acuerdo con este gráfico, en la condición control el 50% de las motoneuronas produjo un potencial de acción con valores de reobase  $\leq 48,2$  pA; mientras que en presencia de GABA el 50% de las motoneuronas produjo un potencial de acción con reobase  $\leq 127.6$  pA. Por otra parte, se puede observar que el 100% de las motoneuronas generó un potencial de acción con una reobase  $\leq 150$  pA en la condición control, mientras que en presencia de GABA casi el 50 % de las motoneuronas no produjo potencial de acción a esta intensidad de corriente. No se encontró ninguna relación entre la amplitud del cambio en reobase (reobase en presencia de GABA - reobase en condición control) y la resistencia de entrada, lo que indica que el cambio en la corriente umbral de reclutamiento es independiente del tamaño de la célula (Figura 4.16C).

El bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> por gabazina no modificó el voltaje umbral de reclutamiento, mientras que los valores de reobase disminuyeron (figura 5.16D; tabla 5.2). La disminución en la reobase fue diferente entre las motoneuronas (figura 5.16E,F). Todas las motoneuronas se reclutaron para un valor de reobase  $\leq 125$  pA en presencia de gabazina, mientras que  $\sim 15$  % de las motoneuronas no se reclutaron con esta corriente en la condición control. Sin embargo, el 50% de las motoneuronas se reclutaron con una reobase  $\leq 50$  pA, en la condición control y en presencia de gabazina, no observándose ningún cambio en los valores de reobase (control vs. gabazina) entre las motoneuronas que se reclutaron a corriente más bajas (figura 5.16E). Además, el cambio en la reobase (reobase en presencia de gabazina – reobase en condición control) y la resistencia en condición control mostró una buena relación lineal (Figura 5.16F). Estos resultados indican que la gabazina ejerce un efecto más importante sobre la reobase de las motoneuronas con umbral alto de reclutamiento (es decir, con baja resistencia de entrada y mayor tamaño).





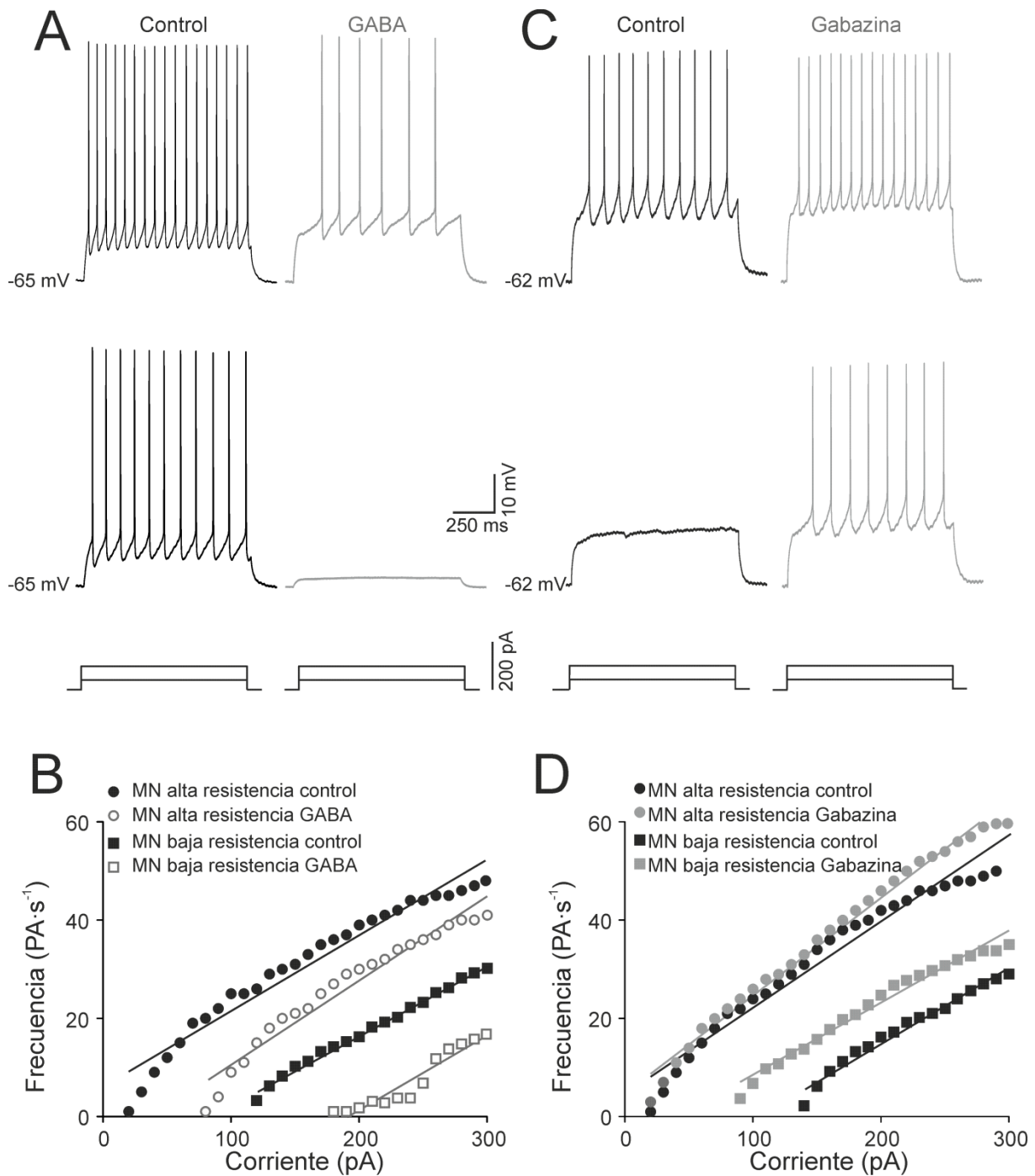
**Figura 5.16. Efectos del GABA (100  $\mu$ M) y de la gabazina (20  $\mu$ M) sobre la reobase de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.** A, D, registros de la corriente mínima (reobase) requerida para generar un potencial de acción en la condición control y en presencia de GABA (A) o gabazina (D) en dos motoneuronas diferentes. B, E, diagramas acumulativos normalizados de la reobase en condición control y durante la exposición a GABA (B) o gabazina (E). Las líneas discontinuas señalan los valores de reobase ( $I_{50}$ ) en los que el 50% de las motoneuronas generó un potencial de acción. C, F, relación entre la resistencia de entrada en condición control y el cambio de reobase producido por la exposición a GABA (C) o gabazina (F).



#### 5.4.5. Efecto de la activación y bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> sobre la relación intensidad de corriente – frecuencia de disparo (*I-F*).

Por último, se estudió el efecto de GABA 100  $\mu\text{M}$  o de la gabazina en la relación intensidad de corriente inyectada frente a frecuencia de disparo de potenciales de acción producida (relación *I-F*). Algunas de las motoneuronas (12/ 35) dispararon sólo unos pocos potenciales de acción al inicio del estímulo en respuesta a pulsos de corriente de intensidad alta ( $> 200 \text{ pA}$ ) cuando se añadió GABA a la cámara de registro. Estas motoneuronas se descartaron para el análisis ya que no mantuvieron un disparo tónico de potenciales de acción. La figura 5.17A,B muestra la respuesta del potencial de membrana de una motoneurona a pulsos de corriente supraumbrales en la condición control y en presencia de GABA. En respuesta a corrientes de 50 y 100 pA, la motoneurona generó 11 y 17  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en la condición control, mientras que en presencia de GABA la motoneurona no generó potenciales de acción en respuesta a pulsos de corriente de 50 pA y sólo disparó 6  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en respuesta a pulsos de 100 pA (figura 5.17A). La figura 5.17B muestra las relaciones *I-F* para dos motoneuronas con diferentes resistencias de entrada. En presencia de GABA 100  $\mu\text{M}$  se observó un desplazamiento hacia la derecha en la relación *I-F* que fue similar en ambas motoneuronas. Por lo tanto, el GABA produjo un aumento en el umbral de reclutamiento, pero no modificó de forma importante la ganancia. Este hallazgo fue semejante para toda la población de motoneuronas estudiadas (tabla 5.2).

La figura 5.17C ilustra la respuesta de una motoneurona con resistencia de entrada baja a dos pulsos de corriente despolarizante en condición control y en presencia de gabazina. Esta motoneurona no produjo potenciales de acción en la condición control en respuesta a estímulos de 50 pA, mientras que produjo 8  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en presencia de gabazina; para estímulos de 100 pA la motoneurona produjo 10  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en la condición control y 15  $\text{PA} \cdot \text{s}^{-1}$  en presencia de gabazina. La figura 4.17D muestra las relaciones *I-F* para dos motoneuronas con diferentes resistencias de entrada. La motoneurona con resistencia de entrada alta (pequeño tamaño) no modificó ni su umbral de reclutamiento ni su ganancia cuando se comparó la condición control y en presencia de gabazina. Por el contrario, la motoneurona de resistencia baja (tamaño grande) mostró un desplazamiento hacia la izquierda en la relación *I-F*, con una modesta disminución en la ganancia cuando se expusieron a gabazina. Este hallazgo sugiere que la gabazina reduce el umbral de reclutamiento en función de la resistencia de entrada en la condición control, sin modificación significativa de la ganancia (tabla 5.2).



**Figura 5.17. Efectos del GABA (100  $\mu\text{M}$ ) y de la gabazina (20  $\mu\text{M}$ ) sobre la relación  $I$ - $F$  en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata. A, C, respuesta de la misma motoneurona a dos pulsos de corriente de diferentes intensidades en condición control y en presencia de GABA (A) o gabazina (C). B, D, relaciones  $I$ - $F$  para dos motoneuronas representativas, con resistencia de entrada baja y alta, en la condición control y durante la exposición a GABA (B) o gabazina (D).**

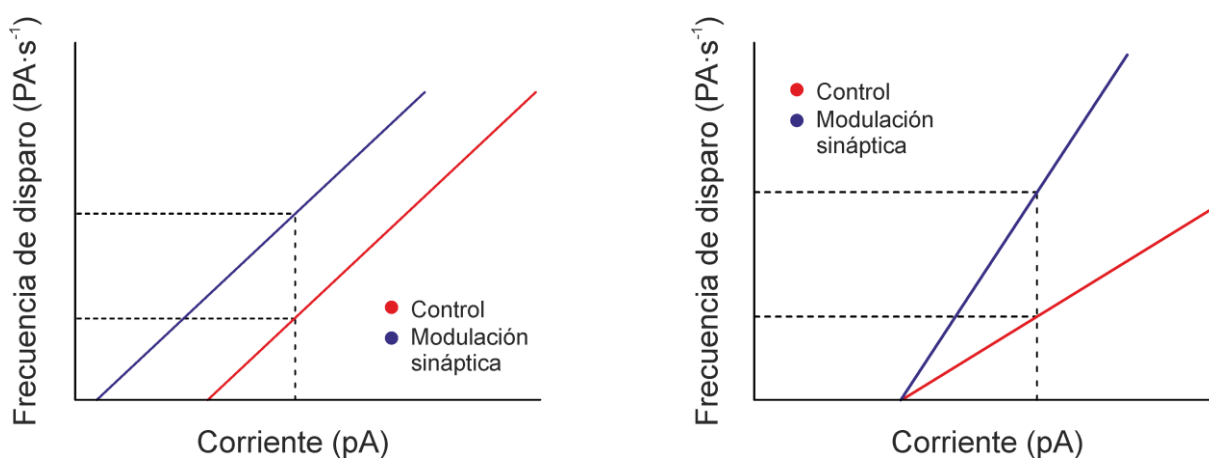
## **6. DISCUSIÓN**



### 6.1. Modulación de la excitabilidad neuronal por glutamato y GABA.

La excitabilidad neuronal depende de cómo cada neurona responda a un estímulo. La función neuronal entrada-salida se puede modular modificando el umbral de reclutamiento y ganancia. Estos dos parámetros se pueden estudiar a través de las relaciones que se establecen entre intensidad del estímulo y generación de potenciales de acción (relación  $I$ - $F$ ). Los neurotransmisores (excitadores e inhibidores) pueden cambiar esta relación por dos vías: un cambio en el eje de las  $x$  (entrada) implicaría modificaciones dinámicas tanto en el umbral de reclutamiento de cada neurona, como en el reclutamiento para toda una población de neuronas; mientras que un cambio en el eje de las  $y$  (en la pendiente o ganancia de la relación  $I$ - $F$ ) produciría la amplificación o la disminución de la sensibilidad de la neurona en respuesta a las mismas entradas (figura 6.1; Rothman y col., 2009).

Este trabajo demuestra que el glutamato modula las propiedades activas de membrana (voltaje umbral y ganancia de la relación  $I$ - $F$ ), y la corriente tónica de GABA modula las propiedades pasivas de membrana (resistencia de entrada). La capacidad de modulación aumenta con el umbral de reclutamiento de las motoneuronas (es decir, con el tamaño celular). En otros términos, mientras que las motoneuronas pequeñas apenas modificaron su umbral de reclutamiento o ganancia en respuesta a estos neurotransmisores, las motoneuronas de gran tamaño pudieron modificar dinámicamente (en función de la cantidad de neurotransmisor y de su eficacia a través de los receptores) en un amplio rango tanto el umbral de reclutamiento como la ganancia. Estos mecanismos de modulación refinan el reclutamiento y la ganancia de las unidades motoras permitiendo gran precisión y velocidad de los movimientos oculares.



**Figura 6.1. Mecanismos de modulación de la excitabilidad neuronal. A,** modulación mediada por modificación del umbral de reclutamiento. **B,** modulación mediada por modificación de la ganancia de la relación  $I$ - $F$ . Modificado de Rothman y col., 2009.

## **6.2. Modulación de la función entrada-salida por glutamato en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.**

### **6.2.1. Determinación del umbral de reclutamiento.**

La corriente umbral de reclutamiento puede ser cuantificada desde la corriente requerida para producir un potencial de acción (reobase) o desde la corriente requerida para producir un disparo repetitivo de potenciales de acción. En esta parte del trabajo, se estudió las modificaciones en los componentes tónicos y fásicos de las propiedades de disparo frente a la corriente umbral de reclutamiento del disparo repetitivo porque se asemeja al procedimiento que se usa en experimentos de animal alerta para determinar el umbral de reclutamiento de las motoneuronas. En preparaciones *in vivo*, el umbral de reclutamiento es inferido desde la relación entre frecuencia tónica de disparo y posición ocular (Delgado-García y col., 1986; Fuchs y col., 1988). Por otro lado, se ha demostrado que la variabilidad en el disparo repetitivo disminuye con el incremento en la frecuencia (Piotrkiewicz, 1999; Power y Binder, 2000). Por ello, se ha representado la desviación estándar frente al valor medio de frecuencia en estado estable ajustándose los datos a dos rectas de regresión lineal (una para las frecuencias bajas - alta variabilidad y otra para las frecuencias altas - baja variabilidad). El punto de ruptura (la intensidad de corriente a la que las rectas se intersectan) se toma como corriente umbral de reclutamiento del disparo repetitivo. Además, a esta intensidad de corriente umbral se produce la frecuencia mínima de disparo repetitivo, y la duración de la fase de posthiperpolarización del potencial de acción se relaciona significativamente con la duración de la fase de posthiperpolarización del potencial de acción unitario (no repetitivo) en motoneuronas (Kernell, 1965; Viana y col., 1995; Power y Binder, 2000; González Forero y col., 2002; Carrascal y col., 2006; Nieto-González y col., 2007). Por lo tanto, la determinación de la corriente mínima para la generación de un disparo repetitivo estable es una medida fiable de la corriente umbral de reclutamiento (Power y Binder, 2000). Además, los valores de corriente umbral de disparo repetitivo y de reobase están estrechamente relacionados (Kernell y col., 1999).

### **6.2.2. Modulación del umbral de reclutamiento por glutamato.**

Las amplitudes de las entradas sinápticas desde distintos sistemas varían sistemáticamente en motoneuronas espinales de umbral bajo y alto (Heckman y Binder, 1993a,b). Como consecuencia, se conocen poblaciones de motoneuronas que expanden o comprimen el rango de umbral de reclutamiento. De hecho, la activación de las aferencias la del músculo homónimo en motoneuronas espinales genera una corriente sináptica más efectiva en las motoneuronas de umbral bajo y produce una expansión en el rango de reclutamiento de las motoneuronas (Heckman y Binder, 1988); por el contrario, las

corrientes sinápticas del tracto rubroespinal comprimen el rango de reclutamiento porque excitan en mayor medida a las motoneuronas de umbral alto (Heckman y Binder, 1993 a,b; Powers y col., 1993). En las motoneuronas del núcleo motor ocular externo, la pérdida de aferencias sinápticas inhibitorias o inhibitorias-excitadoras producida por dosis bajas o altas de la neurotoxina tetánica modifica el umbral de reclutamiento. El umbral de reclutamiento medio disminuye con ambas dosis, pero el rango de reclutamiento se estrecha con dosis bajas y se expande con dosis altas (Pastor y González-Forero, 2003). Además, la estimulación eléctrica vestibular apoya la hipótesis de que las corrientes sinápticas hiperpolarizantes y despolarizantes son más efectivas en las motoneuronas del núcleo motor ocular externo con umbral de reclutamiento alto (Broussard y col., 1995). Estos hallazgos demuestran que las entradas sinápticas influyen sobre el rango de umbral de reclutamiento. En este estudio se encontró que la activación de los receptores glutamatérgicos en las motoneuronas del núcleo motor ocular común modula el umbral de reclutamiento: disminuyendo la reobase y el voltaje de despolarización, y comprimiendo el rango de reclutamiento. Estos resultados podrían ser atribuibles a un incremento de la resistencia de entrada o a una disminución del voltaje umbral. El análisis de los datos de este trabajo descarta a la resistencia de entrada porque los cambios en este parámetro no coviaron con los cambios en reobase y voltaje de despolarización. El mantenimiento de los valores de resistencia de entrada en presencia de glutamato encontrado en este estudio *in vitro* está de acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo* en motoneuronas del núcleo motor ocular externo expuestas a glutamato (Durand y col., 1987). Además, se ha descrito que la activación selectiva de diferentes tipos de receptores glutamatérgicos disminuyen (Iwagaki y Miles, 2011), incrementan (Del Negro y Chandler, 1998; Marchetti y col., 2005), o no modifican la resistencia de entrada (Chapman y col., 2008) dependiendo de la población de motoneuronas. En relación al voltaje umbral, se ha descrito en motoneuronas espinales que la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I disminuye el voltaje umbral que precede al potencial de acción (Iwagaki y Miles, 2011). Los mecanismos que subyacen a la modulación del voltaje umbral no están claros, pero se ha propuesto la modulación de las corrientes persistentes de sodio (Carlier y col., 2006) y de las conductancias de potasio (Dai y col., 2002).

Según el principio de tamaño (Henneman y col., 1965; Mendell, 2005) el orden de reclutamiento de las motoneuronas depende la resistencia de entrada. Las motoneuronas de pequeño tamaño, con valores de resistencia más elevados, producen mayores cambios en voltajes para una misma entrada sináptica que las motoneuronas de gran de tamaño. Por tanto, las motoneuronas pequeñas pueden alcanzar el voltaje umbral con una entrada sináptica excitadora menor, si se comparan con las motoneuronas de mayor tamaño. En

este trabajo se ha demostrado que en las motoneuronas del núcleo motor ocular común existe una relación inversa entre tamaño celular y resistencia de entrada y entre ésta última y la corriente umbral. De acuerdo a estos hallazgos, las primeras motoneuronas en reclutarse son aquellas de pequeño tamaño. En preparaciones alerta, la relación entre la velocidad de conducción y los umbrales de reclutamiento de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo es escasa en gato, mientras que no se ha encontrado en monos y en la carpa dorada (Delgado-García y col., 1986; Fuch y col., 1988; Pastor y col., 1991; Pastor y González-Forero, 2003). Estos resultados apoyan la idea de que el orden de reclutamiento, basado exclusivamente en el principio del tamaño, no es un criterio suficiente para ordenar el reclutamiento de las poblaciones de motoneuronas (Pastor y col., 1991). En este trabajo, el rango de umbral de reclutamiento se comprimió por una disminución del voltaje umbral de las motoneuronas de umbral alto. Este resultado es consistente con los datos aportados en motoneuronas espinales en respuesta a la activación de las entradas del núcleo rubroespinal (Power y col., 1993). Asumiendo que el orden de reclutamiento depende principalmente del tamaño celular, los efectos glutamatérgicos demostrados aquí son más pronunciados en las motoneuronas más grandes. Tanto es así que la modulación glutamatérgica podría explicar la correlación escasa que se ha descrito entre la velocidad de conducción y el umbral de reclutamiento descrito en preparaciones alerta.

### **6.2.3. Modulación de la ganancia de la relación $I$ - $F$ por glutamato.**

Las entradas sinápticas pueden modificar la relación entrada-salida en las motoneuronas alterando la ganancia (pendiente) de la relación  $I$ - $F$  (Binder y col., 1993; Heckman y col., 2003; McElvain y col., 2010). El incremento en la ganancia hallado en este trabajo podría deberse a la modulación glutamatérgica sobre la fase de posthiperpolarización del potencial de acción (Anwyl, 1999; Young y col., 2004; Ruiz, 2011). Esta modulación de la ganancia podría deberse a la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I de glutamato, ya que se ha demostrado que bloquean las corrientes dependientes de voltaje,  $I_M$  y de calcio, de la fase de posthiperpolarización (Anwyl, 1999; Young y col., 2004).

Por otro lado, las motoneuronas oculares muestran un disparo tónico que es proporcional a la posición ocular, y generan el tono muscular que compensa las fuerzas elásticas que llevarían de nuevo al ojo a su posición inicial (Robinson, 1970). En estudios en preparaciones alerta se ha encontrado que las motoneuronas comienzan a disparar cuando la posición ocular alcanza un valor umbral en la dirección de activación. Por encima del umbral, la frecuencia de disparo varía linealmente con la posición ocular, con una pendiente  $k$ . Se acepta que los valores de umbral de reclutamiento y  $k$  están relacionados: las



motoneuronas con umbrales más altos tienen valores para  $k$  mayores (Delgado-García y col., 1986; Fuch y col., 1988; de la Cruz y col., 1989). En estudios *in vitro* se ha demostrado que existe una relación inversa entre el umbral de reclutamiento y la ganancia de la relación  $I$ - $F$ , las motoneuronas con umbrales de reclutamiento más bajos tienen mayores ganancias (Nieto-González y col., 2007). Asumiendo que esta ganancia mimetizara a  $k$ , estos resultados estarían en desacuerdo con aquellos descritos *in vivo*. Por esta razón se ha descartado a las propiedades intrínsecas de membrana como el único factor que determina la covariación entre el umbral de reclutamiento y  $k$ . La covariación negativa entre la ganancia de la relación  $I$ - $F$  y el umbral de reclutamiento existente en la condición control usando preparaciones *in vitro* desaparece tras la aplicación de glutamato. Sin embargo, no se obtuvo una covariación positiva entre ambas variables como se esperaría de los datos obtenidos en preparaciones alerta. Estos resultados sugieren que las entradas glutamatérgicas en combinación con otros neurotransmisores y/o factores tróficos del músculo deberían estar actuando para producir una relación funcional positiva entre el umbral de reclutamiento y  $k$  en las motoneuronas en preparaciones alerta.

#### **6.2.4. Modulación del componente fásico de frecuencia de potenciales de acción por glutamato.**

Las motoneuronas oculares generan un brote de potenciales de acción (disparo fásico) para realizar los movimientos oculares sacádicos. Esta actividad en brote se requiere para superar la resistencia viscoelástica e inercial del globo ocular (Robinson, 1970). La covariación positiva entre el cambio en la frecuencia fásica y el umbral de reclutamiento descrita aquí podría contribuir al hallazgo de que las motoneuronas con umbrales de reclutamiento más alto tienen una sensibilidad a la velocidad ocular mayor (Davis-López de Carrizosa y col., 2011). Por otro lado, la presencia de glutamato produjo en las motoneuronas un aumento ligeramente superior del componente fásico frente al componente tónico del disparo repetitivo. Dado que los pulsos de corriente supraumbrales producen los componentes fásicos y tónicos del disparo repetitivo en las motoneuronas del núcleo motor ocular común, es evidente que este patrón de disparo lleva implícito que las propiedades intrínsecas de membrana estén activas. Como se ha propuesto en otras poblaciones neuronales, las conductancias que subyacen a este patrón de disparo puede ser moduladas por glutamato (Young y col., 2004; Cosgrove y col., 2011; Iwagaki y Miles, 2011). Otra posibilidad sería que el glutamato afectase en mayor medida a las entradas sinápticas fásicas que a las tónicas. Esta hipótesis estaría sustentada en que las neuronas premotoras envían señales fásicas y tónicas de forma separada a las motoneuronas (Scudder y col., 2002; Sparks, 2002) y en que las entradas sinápticas fásicas y tónicas pueden ser restablecidas independientemente (Davis-López de Carrizosa y col., 2009).

### 6.2.5. Implicaciones funcionales.

Durante las últimas dos décadas ha habido un consenso general acerca de que el patrón de disparo de potenciales de acción de las motoneuronas oculares es bastante homogéneo. Todas las motoneuronas muestran una actividad cualitativamente similar que consiste en una actividad fásica relacionada con los movimientos sacádicos y una actividad tónica relacionada con la posición ocular (Delgado-García y col., 1986; Fuchs y col., 1988; Pastor y col., 1991). Estudios recientes en preparaciones alerta apoyan la idea de que las motoneuronas oculares podrían ser clasificadas en un continuo de grupos celulares superpuestos, el primer grupo en ser reclutado son moderadamente tónicas mientras que el último en reclutarse son relativamente fásicas (Davis-López de Carrizosa y col., 2011). Además, la información disponible en preparaciones de rodajas cerebrales de los núcleos motor ocular común y troclear clasifican a las motoneuronas en un continuo entre dos modelos extremos que se diferencian en la forma del potencial de acción, índice de adaptación y el rango dinámico (Nieto-González y col., 2007, Jones y Ariel, 2008). Las motoneuronas expuestas a glutamato muestran un aumento del disparo fásico-tónico en función del umbral de reclutamiento. En resumen, las propiedades intrínsecas de membrana, la respuesta a aminoácidos excitadores y el patrón de disparo funcional apoya la idea de que las motoneuronas oculares son menos homogéneas de lo que inicialmente se propuso.

El umbral de reclutamiento y la frecuencia de disparo de las motoneuronas determinan la contracción muscular. Este trabajo demuestra que las motoneuronas con umbral de reclutamiento bajo, con resistencia de entrada alta y pequeño tamaño, exhiben un disparo tónico o moderadamente fásico que permanece esencialmente igual en presencia de glutamato. Se ha propuesto que las motoneuronas más tónicas, es decir con un componente fásico pequeño, proyectan a las fibras de innervación múltiple o de contracción lenta que son más adecuadas para las fijaciones oculares (Büttner-Ennever y col., 2001; Eberhorn y col., 2005, 2006; Nieto-González y col., 2007; Davis López y col., 2011). Por el contrario, las motoneuronas con umbral de reclutamiento alto, que tienen bajas resistencias de entrada y posiblemente gran tamaño, muestran un disparo fásico-tónico cuya frecuencia incrementa en presencia de glutamato. Estas motoneuronas podrían proyectar a las fibras de innervación simple o de contracción rápida (Büttner-Ennever y col., 2001) con diferentes velocidades de contracción y fatigabilidad (Nelson y col., 1986) y podrían generar una contracción muscular más vigorosa bajo la modulación glutamatérgica. La activación de estos receptores podría contribuir a realizar los movimientos oculares sacádicos con diferentes velocidades y/o al mantenimiento de las posiciones oculares más excéntricas en la órbita.

### **6.3. Modulación de la función entrada-salida por GABA en las motoneuronas del núcleo motor ocular común de la rata.**

#### **6.3.1. Contribución de los receptores GABA<sub>A</sub>.**

Este estudio demuestra que las motoneuronas del núcleo motor ocular común muestran una corriente tónica inhibitoria en un ambiente donde la concentración de GABA es baja (es decir, sin añadir GABA a la cámara de registro). En este ambiente de GABA, el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> por gabazina provocó un aumento de la resistencia de entrada y una disminución en el umbral para el reclutamiento del potencial de acción en función del tamaño celular. Cuando se añadió a la cámara de registro GABA 100  $\mu$ M, las motoneuronas produjeron una corriente de entrada que fue bloqueada por gabazina, y llevó el potencial de membrana hasta valores  $\sim -67$  mV (cerca del potencial de reversión del cloro). Estos dos resultados sugieren que los efectos de una concentración alta de GABA están mediados principalmente por la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>. Esta sugerencia está también de acuerdo con los datos de otros trabajos que demuestran la baja densidad de receptores GABA<sub>B</sub> en los núcleos motores oculares (Margeta-Mitrovic y col., 1999) y la ausencia en la membrana de las motoneuronas de estos receptores (Russier y col., 2002). Sin embargo, la contribución de los receptores GABA<sub>B</sub> y de los receptores, poco frecuentes GABA<sub>C</sub> (Chesnoy - Marchais, 2013) no se puede descartar completamente.

Independiente del tamaño de la célula, la alta concentración de GABA ambiente disminuyó la resistencia de entrada, y originó constantes de tiempo más cortas, y un aumento del umbral de reclutamiento de las motoneuronas sin un cambio en la ganancia de la relación  $I$ - $F$ . Debido a que las concentraciones bajas de GABA, pero no las altas, modulan la resistencia de entrada y el umbral de reclutamiento en función del tamaño de las motoneuronas, se infiere que han de estar implicados diferentes tipos de receptores GABA<sub>A</sub> en estas distintas respuestas. Nosotros proponemos que los efectos de GABA 100  $\mu$ M se deben principalmente a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> de baja afinidad (es decir, los que participan en los potenciales –corrientes – postsinápticos inhibitorios de carácter transitorio), mientras que los efectos de la gabazina se deben principalmente al bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad. De acuerdo con otros estudios (Semyanov y col., 2003; Scimemi y col., 2005; Park y col., 2006; Gao y Smith, 2010), los efectos de la gabazina en las motoneuronas del núcleo motor ocular común son consecuencia principalmente del bloqueo de la corriente inhibitoria tónica porque constituyó el 85% de la corriente total mediada por los receptores GABA<sub>A</sub>. Esta corriente tónica se debe a la activación persistente de una población heterogénea de receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad localizados en regiones extrasinápticas (Semyanov y col., 2004; Farrant y Nusser, 2005;

Glycks y Mody, 2007). Por otro lado, la alta concentración de GABA extracelular (GABA 100  $\mu$ M) activa tanto a los receptores GABA<sub>A</sub> de baja afinidad como a los de alta afinidad (Mortensen y col., 2004; Stórustovu y Ebert, 2006), aunque estos últimos tendrían menos peso por ser menos abundantes que los de baja afinidad (Nusser y col., 1995). Teniendo todo esto en cuenta sugerimos que la efectividad sináptica mediada a través de los receptores de alta afinidad para GABA, no así los de baja afinidad, modulan el umbral de reclutamiento dependiendo del tamaño de las motoneuronas.

### 6.3.2. Modulación de la ganancia por GABA.

Está ampliamente aceptado que las concentraciones de GABA ambientales juegan un papel importante en la excitabilidad celular. Estudios *in vivo* han demostrado que las inyecciones por iontoforesis de GABA o gabazina producen una disminución o un aumento, respectivamente, en la frecuencia de disparo de las neuronas en respuesta a estímulos sensoriales (Ingham y McAlpine, 2005; Duguid y col., 2012; Duque y col., 2014). Como se ha descrito en la introducción, la ganancia es uno de los dos componentes que caracterizan la relación de entrada - salida de un sistema. A nivel de neurona, la ganancia se define como la pendiente de la relación *I-F*. En el presente estudio, la ganancia se determinó aplicando pulsos de corriente constante con diferentes intensidades y midiendo la frecuencia de potenciales de acción de las motoneuronas en presencia de GABA 100  $\mu$ M o gabazina. En estas condiciones se encontró un desplazamiento hacia la derecha (en presencia de GABA) o hacia la izquierda (en presencia de gabazina) de la relación *I-F*, sin que la pendiente de la relación (la ganancia) se modificase significativamente. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que han utilizado un protocolo similar. Así, el bloqueo de la inhibición tónica en las células granulares del cerebelo disminuye la corriente necesaria para lograr una frecuencia de disparo determinada, y este resultado se explicó por el desplazamiento hacia la izquierda de la relación *I-F* (Brickley y col., 1996; Hamann y col., 2002; Chadderton y col., 2004); en las motoneuronas espinales se ha descrito como en proporción al aumento de la conductancia ocurre el cambio en la relación *I-F*, sin cambios en la ganancia (Brizzi y col., 2004). Por otra parte, la ganancia de la relación entrada-salida se ha estudiado utilizando estímulos que hacen fluctuar el potencial de membrana con características semejantes a las modificaciones que acontecen durante la transmisión sináptica (esta función se la denomina ruido sináptico y son introducidas en las neuronas mediante funciones de software denominadas “dynamic clamp”), en lugar de pulsos de corriente constante. Con este procedimiento, se ha sugerido que las entradas sinápticas inhibitorias de una neurona pueden actuar controlando la ganancia del sistema (Chance y col., 2002). En general, la inhibición tónica aplicada junto a la entrada excitadora produce una modesta disminución de la ganancia (Mitchell y Silver, 2003; Rothman y col., 2009). De

hecho, se ha descrito que las corrientes tónicas de GABA tienen un efecto mínimo a nivel subumbral del potencial membrana debidas al ruido sináptico, por lo que afecta exclusivamente al umbral de reclutamiento neuronal y no a la ganancia (Pavlov y col., 2009). Estos resultados sugieren que las concentraciones de GABA ambiente no modifican la ganancia de la relación entrada-salida, o contribuyen sólo de una manera muy sutil al ajuste de la misma.

### **6.3.3. Modulación del umbral de reclutamiento por GABA.**

Los motoneuronas que inervan a los músculos esqueléticos se activan de forma ordenada para gobernar la contracción muscular. De acuerdo con el principio del tamaño, el orden de reclutamiento de las motoneuronas se considera que depende de la resistencia de entrada y, por lo tanto, del tamaño de las células (Heneman y col., 1965, Mendell, 2005). Sin embargo, el orden de reclutamiento también puede variar con los patrones de actividad de las neuronas aferentes y con la organización de la entrada sináptica (Heckman y Binder, 1993; Cope y Sokoloff, 1999). El estudio de la eficacia de las entradas sinápticas de diferentes sistemas ha demostrado que varían de forma sistemática según el umbral de las motoneuronas sea bajo o alto (Heckman y Binder, 1993). Por ejemplo, las entradas aferentes excitadoras procedentes de los husos musculares homónimos generan una corriente sináptica más eficaz en las motoneuronas de umbral bajo comparadas con las motoneuronas de umbral alto (Heckman y Binder, 1988), mientras que las entradas vestibulo-espinales, cortico-espinal, o rubro-espinales, son más eficaces en las motoneuronas con umbral de reclutamiento alto (Powers y col., 1993; Westcott y col., 1995; Binder y col., 1998). Por otra parte, las entradas excitadoras producen una respuesta mayor en las motoneuronas oculares con mayores umbrales (Broussard y col., 1995; Torres-Torrelo y col., 2012). Los resultados de este estudio muestran que, bajo condiciones control e *in vitro*, el orden de reclutamiento de las motoneuronas del núcleo motor ocular común de ratas jóvenes se determina por el tamaño de la célula-resistencia de entrada y que una concentración alta de GABA ambiente disminuye la excitabilidad de las motoneuronas independientemente del tamaño de celular. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en las motoneuronas espinales después de la estimulación eléctrica de las entradas sinápticas inhibitorias (Heckman y Binder, 1991) o con los obtenidos en el núcleo motor ocular externo por pérdida de las aferencias inhibitorias (Pastor y González-Forero, 2003). En conclusión, las corrientes mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub> que fueron activadas por la alta concentración de GABA no alteran el orden de reclutamiento de las motoneuronas del núcleo motor ocular común.

El bloqueo de la corriente tónica por gabazina produce efectos en el umbral de reclutamiento que dependen del tamaño de las motoneuronas. Las motoneuronas de umbral bajo se mostraron relativamente poco afectadas por la gabazina, mientras que las motoneuronas de umbral alto mostraron una disminución del umbral de corriente para el reclutamiento del potencial de acción (hasta ~ 25 %). La intensidad de la corriente tónica depende de diferentes factores tales como el nivel de expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad, la cinética de cada tipo de receptor de alta afinidad y distintos factores moduladores del receptor (Ortinski y col., 2006; Walker y Semyanov, 2008). Sin embargo, el factor fundamental que regula la intensidad de esta corriente es la concentración de GABA extracelular que, a su vez, depende principalmente de los recaptadores de GABA (Richerson y Wu, 2003; Kersanté y col., 2013). De hecho, estudios *in vivo* de micro-diálisis han demostrado que la concentración extracelular de GABA puede variar en un rango de hasta tres veces (Bianchi y col., 2003). Por lo tanto, la modulación de los niveles de GABA extracelular y de la corriente tónica, junto con la disminución en el umbral de reclutamiento conforme incrementa el tamaño de las motoneuronas podría contribuir a ampliar o reducir el umbral de reclutamiento y a modificar la excitabilidad de las motoneuronas. Estos efectos se realizarían a través de los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad.

#### **6.4. Implicaciones funcionales: Un sistema orquestado mediado por glutamato y GABA modula la función entrada-salida en las motoneuronas del núcleo motor ocular común.**

La hipótesis actual sugiere que las entradas sinápticas a las motoneuronas determina la covariación positiva entre umbral de reclutamiento y sensibilidad a la posición ocular (ver introducción). Las entradas sinápticas para la posición ocular en los planos horizontal y vertical se originan en diferentes regiones del tronco del cerebro, aunque estas regiones están interconectadas (Scudder y col., 2002). El núcleo motor ocular externo recibe señales inhibitoras desde el núcleo prepositus hipoglossi contralateral y desde el núcleo vestibular medial homolateral. Estas señales inhibitoras están balanceadas por señales excitadoras desde el núcleo prepositus hipoglossi homolateral y desde el núcleo vestibular medial contralateral (Scudder y Fuchs, 1992). En el núcleo intersticial de Cajal se localizan las neuronas premotoras de actividad tónica inhibitora (Horn y col., 2003) y, presumiblemente, excitadora (Ahlfeld y col., 2011) que proyectan a los motoneuronas de los músculos extraoculares del plano vertical. La señal de posición ocular en el plano vertical también es proporcionada por neuronas de los núcleos vestibulares. Las neuronas que se localizan en el núcleo vestibular superior homolateral llevan señales inhibitoras a las motoneuronas, mientras que las del núcleo vestibular medial contralateral llevan las señales excitadoras (McCrea y col., 1987; Fukushima y Kaneko, 1995; Highstein y Holstein, 2006).

Las entradas inhibitoras al núcleo motor ocular común y troclear están mediadas por GABA y las excitadoras por glutamato (de la Cruz y col., 1992; Spencer y Baker, 1992; Wentzel y col., 1995; Nguyen y Spencer, 1999; Horn y col., 2003; Ying y col., 2008; Ahlfeld y col., 2011; Che Ngwa y col., 2014). Las neuronas del núcleo motor ocular externo reciben entradas excitadoras mediadas por glutamato (Nguyen y Spencer, 1999) mientras que la inhibición es mediada por glicina y GABA (Spencer y col., 1989; Lahjouji y col., 1996; Lorenzo y col., 2007). Las neuronas premotoras excitadoras incrementan su frecuencia de potenciales de acción en la dirección de activación de las motoneuronas, mientras que las entradas sinápticas inhibitoras hacen lo opuesto (figura 6.2A-C; Scudder y col., 2002; Sparks, 2002). De hecho, las motoneuronas son dirigidas por un sistema denominado de “push-pull” por neuronas premotoras con señales excitadoras e inhibitoras (Baker y col., 1981). Estos neurotransmisores actúan de forma transitoria durante la transmisión neuronal y de forma más persistente mediante los receptores de glutamato metabotrópicos y receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad (corriente tónica). Nosotros proponemos que la frecuencia de potenciales de acción de las motoneuronas se debe esencialmente a los mecanismos transitorios de neurotransmisión. Los receptores metabotrópicos de glutamato y los receptores de GABA<sub>A</sub> que median la corriente tónica actuarían como sistemas de modulación para refinar la salida de las motoneuronas de los músculos extraoculares.

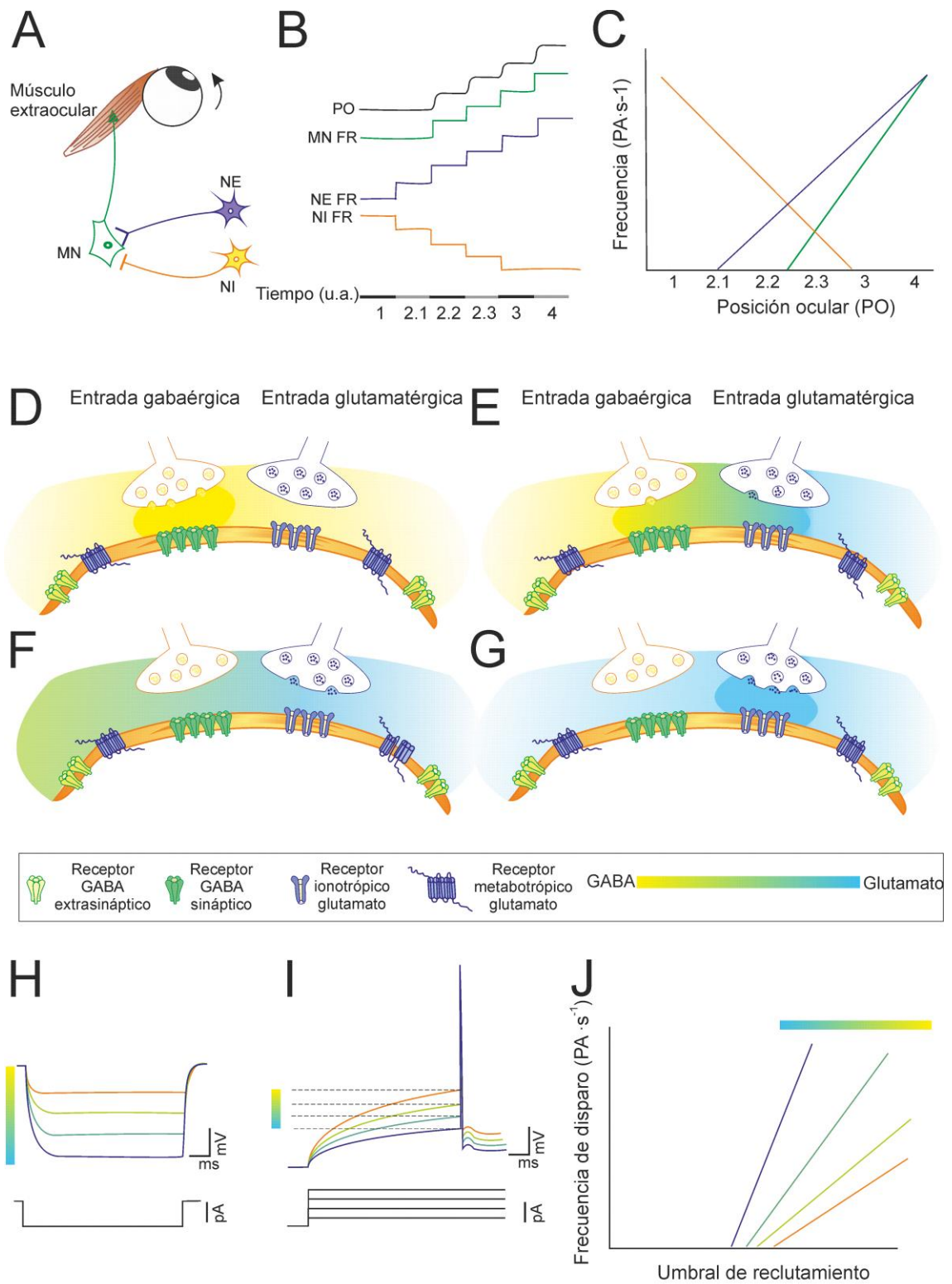
¿Cómo pueden modular la excitabilidad los receptores de glutamato metabotrópicos y los receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad? Nuestra propuesta es que estos receptores funcionan de una forma orquestada fortaleciendo la acción mediada por los receptores postsinápticos transitorios. Así, un aumento en la concentración extracelular de glutamato se acompaña de una reducción proporcional de los niveles de GABA (figura 6.2D-G). De acuerdo a los efectos producidos por el GABA y el glutamato de forma separada, el umbral de reclutamiento disminuiría como consecuencia de un incremento en la resistencia de entrada cuando el ambiente de GABA disminuye (figura 6.2H) o por disminución del voltaje umbral mediado por una gradual activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (figura 6.2I). La activación de los receptores metabotrópicos de glutamato también incrementa ganancia de la frecuencia de disparo (Young y col., 2004; Torres-Torrelo y col., 2012). Los efectos mediados por los receptores metabotrópicos de glutamato y por los receptores GABA<sub>A</sub> que median la actividad tónica permitirían a las motoneuronas ser reclutadas e incrementar su ganancia en la frecuencia de potenciales de acción con menores entradas excitadoras (figura 6.2J)

Como ha sido descrito, la covariación negativa entre umbral y ganancia de la relación *I-F* encontrada en preparaciones in vitro desaparece con la exposición a glutamato (Torres-

Torrelo y col., 2012). Puesto que el GABA no afecta a la ganancia, el origen de la relación positiva encontrada en preparaciones alerta permanece sin aclarar. Una posibilidad sería que los efectos concurrentes de GABA y glutamato fueran mayores que cuando se estudian por separado. Hazel y colaboradores (Hazel y col., 2002) en un modelo de simulación neuronal para el control de la posición ocular tomaron los valores reales de umbral y sensibilidad a la posición ocular registrados en las neuronas premotoras. Las entradas inhibitoras variaron ampliamente con el umbral de reclutamiento de las motoneuronas, mientras que las entradas excitadoras tuvieron un nivel bastante similar. Las entradas inhibitoras fueron pequeñas en las motoneuronas de bajo umbral de reclutamiento y mayores en las motoneuronas de alto umbral de reclutamiento. Bajo estas condiciones, el incremento en la entrada inhibitora produjo un incremento en el umbral y en la sensibilidad a la posición ocular en las motoneuronas, reproduciendo cualitativamente la relación entre umbral de reclutamiento y sensibilidad a la posición ocular descrito en preparaciones de animal alerta. De acuerdo a este modelo, los datos que hemos obtenidos muestran un incremento en la inhibición tónica con el umbral de reclutamiento de las motoneuronas, sin embargo la relación positiva entre umbral y ganancia no se encontró. La relación entrada-salida es diferente cuando una sola fuente es variada en relación a cuando más de una entrada sináptica es concurrentemente activada (Binder y col., 1993). Por lo tanto, se requerirán más experimentos para determinar si la activación concurrente de los receptores GABA<sub>A</sub> que median la inhibición tónica y los receptores metabotrópicos de glutamato reproducirían los resultados obtenidos en preparaciones alerta.

**Figura 6.2. Las entradas sinápticas de glutamato y GABA funcionan de forma orquestada para generar y modular la frecuencia de potenciales de acción en las motoneuronas oculares.** **A**, esquema que muestra a una neurona excitadora (NE) y otra inhibitora (NI) como fuente de entradas sinápticas glutamatérgica y GABAérgicas de las motoneuronas. La frecuencia de disparo de la motoneurona dirige la contracción del músculo extraocular. **B**, esquema de la frecuencia de potenciales de acción (FR) de las neuronas inhibitora (NI) y excitadora (NE) que gobiernan la actividad de las motoneuronas y la contracción muscular según la posición del ojo (PO). La barra corresponde a períodos de tiempo (en unidades arbitrarias, ua) en los que: (1) la neurona excitadora está inactiva, mientras que la neurona inhibitora está en su frecuencia de potenciales de acción máxima; (2.1, 2.2, 2.3) la neurona excitadora produce un aumento y la inhibitora produce una disminución de sus frecuencias de potenciales de acción en diferentes periodos mientras que la motoneurona actúa en su dirección de activación; (3, 4) la neurona excitadora aumenta su frecuencia de potenciales de acción en periodos sucesivos, mientras que la neurona inhibitora se muestra silente. **C**, representación de las frecuencias de potenciales de acción de las neuronas excitadora, inhibitora y de la motoneurona en relación a la posición ocular siguiendo los criterios de actividad mostrados en B. **D-G**, esquema que ilustra la liberación de GABA y glutamato por las neuronas inhibitora y excitadora. Los receptores se localizan en la membrana de la motoneurona. Estos dibujos se corresponden con las condiciones indicadas en las situaciones 1, 2, 3 y 4 de la parte B de esta figura. El gradiente de amarillo a azul representa los niveles de los dos neurotransmisores en la hendidura sináptica y en la región extrasináptica. **H**, la disminución en la concentración de GABA extracelular produce una disminución de la inhibición tónica y un aumento de la resistencia de entrada. **I**, el aumento de la concentración de glutamato produce una disminución de la corriente umbral para la generación del potencial de acción mediante una disminución del voltaje umbral. **J**, efectos concurrentes en el umbral de reclutamiento y la ganancia de una disminución en la corriente tónica mediada por GABA y la activación de receptores de glutamato metabotrópicos.







## **7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



### 7.1. Conclusiones.

1. Las motoneuronas del núcleo motor ocular común se reclutaron de acuerdo al principio del tamaño. Así, las motoneuronas más pequeñas y con mayor resistencia fueron las primeras en ser reclutadas y las motoneuronas de mayor tamaño y menor resistencia fueron las últimas en reclutarse.
2. La exposición de las motoneuronas de los músculos extraoculares a glutamato (5  $\mu\text{M}$ ) no modificó el potencial de membrana de reposo ni la resistencia de entrada. Sin embargo, disminuyó la reobase, el voltaje de despolarización y la corriente requerida para producir una frecuencia tónica de potenciales de acción. Estos cambios se originaron por una disminución en el voltaje umbral probablemente mediada por la activación de receptores metabotrópicos del grupo I.
3. El glutamato comprimió el rango de umbral de reclutamiento en la población de motoneuronas. Este efecto se produjo debido a la relación inversa encontrada entre los cambios en el voltaje umbral y la corriente umbral de reclutamiento. Las últimas motoneuronas en reclutarse mostraron una mayor disminución en el voltaje umbral.
4. La exposición de las motoneuronas oculares a glutamato incrementó la ganancia de la relación  $I$ - $F$  en función del umbral de reclutamiento y del tamaño celular. Así, las últimas motoneuronas en reclutarse duplicaron su ganancia en presencia del neurotransmisor. Este incremento en la ganancia podría deberse a la modulación de la posthiperpolarización del potencial de acción mediada por la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I.
5. El glutamato produjo un incremento en la frecuencia tónica y fásica de potenciales de acción en las motoneuronas de los músculos extraoculares, aunque el incremento en el componente fásico fue proporcionalmente mayor.
6. La exposición de las motoneuronas oculares a un alto ambiente de GABA (GABA 100  $\mu\text{M}$ ) produjo una corriente de entrada mediada por receptores GABA<sub>A</sub>. En estas condiciones, el potencial de membrana se hiperpolarizó hasta valores próximos a -67 mV, disminuyeron la resistencia de entrada y la constante de tiempo y la relación  $I$ - $F$  se desplazó a la derecha sin cambios en la ganancia. Los cambios en la excitabilidad neuronal fueron independientes del tamaño celular.

7. Las motoneuronas de los músculos extraoculares mostraron, en un bajo ambiente de GABA, una corriente tónica inhibitoria dependiente de receptores GABA<sub>A</sub>. El bloqueo de esta corriente no modificó el potencial de membrana de reposo de las células pero produjo un aumento en la resistencia de entrada y una disminución en la corriente umbral de reclutamiento. La relación *I-F* se desplazó a la izquierda sin modificar la ganancia. Los cambios fueron más pronunciados cuanto mayor fue el tamaño celular.
8. Debido a que las concentraciones bajas de GABA, pero no las altas, modulan la resistencia de entrada y la corriente umbral de reclutamiento en función del tamaño de las motoneuronas, se infiere que han de estar implicados diferentes tipos de receptores GABA<sub>A</sub> en estas distintas respuestas. Nosotros proponemos que los efectos de GABA 100  $\mu$ M se deben principalmente a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> de baja afinidad, es decir, los que participan en los potenciales postsinápticos inhibidores de carácter transitorio, mientras que los efectos de la gabazina se deben principalmente al bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos de alta afinidad.
9. En conjunto, los resultados de este trabajo de investigación ponen de manifiesto que los mecanismos glutamatérgicos de modulación de la excitabilidad actúan sobre las propiedades activas de las neuronas, mientras que los mecanismos de actuación de la corriente tónica de GABA operan sobre las propiedades pasivas. Ambos sistemas incrementan sus efectos sobre el umbral de reclutamiento y/o sobre la ganancia con el tamaño celular.
10. En términos funcionales, sugerimos que el glutamato, a través de receptores metabotrópicos y el GABA, a través de receptores extrasinápticos de alta afinidad, actúan de forma orquestada potenciando la acción mediada por los receptores postsinápticos transitorios. Así, un aumento en la concentración extracelular de glutamato se acompañaría de una reducción de los niveles de GABA. Estas modificaciones actuarían de forma sinérgica modulando la excitabilidad celular y permitirían refinar la salida, modulando la tasa de disparo de potenciales de acción de las motoneuronas, para realizar fijaciones oculares, incluso en posiciones muy excéntricas del ojo en la órbita, y movimientos oculares de gran velocidad.

## 7.2. Conclusions.

1. The rat oculomotor nucleus motoneurons were recruited in accordance with the size principle. Small motoneurons with high input resistance were the first to be recruited and large motoneurons with low input resistance were the last to be recruited.
2. Motoneurons exposed to glutamate (5  $\mu$ M) did not modify either resting membrane potential or input resistance. However, glutamate produced a decrement in the rheobase, the depolarization voltage and the current required to produce a tonic firing rate. These changes originate by a diminution in voltage threshold, which was probably attributable to the activation of group I metabotropic glutamate receptors.
3. The recruitment threshold range of the motoneuron population was compressed with exposure to glutamate. This finding was due to the inverse relationship found between voltage threshold changes and recruitment threshold current. The later recruited motoneurons showed a larger decrement in voltage threshold.
4. Extraocular muscle motoneurons increased the gain of the  $I$ - $F$  relationship as a function of the recruitment threshold and cell size. Thus, the last motoneurons to be recruited showed a gain twofold higher when exposed to glutamate. This increase in firing rate gain was probably due to a shortening in the spike afterhyperpolarization mediated by the activation of the group I glutamate metabotropic receptors.
5. When motoneurons were exposed to glutamate, tonic and phasic firing rate increased, but the increase in phasic firing was greater than that of tonic firing.
6. In a high ambient GABA (100  $\mu$ M) concentration, extraocular muscle motoneurons showed an inward current. This current was mediated by GABA<sub>A</sub> receptors. Under these conditions, the membrane potential drifted from  $\sim -62$  mV to values close to  $-67$  mV, input resistance and membrane time constant decreased, and  $I$ - $F$  relationships shifted to the right. Changes in these parameters were independent of cell size.
7. In the absence of exogenous GABA, the extraocular muscle motoneurons showed a tonic inhibitory current mediated by GABA<sub>A</sub> receptors. The blockage of this current by gabazine (20  $\mu$ M) did not modify the membrane potential, but increased input resistance and decreased recruitment threshold current. The  $I$ - $F$  relationship shifted to left without modification in gain. These changes were more pronounced in larger cells.

8. Because low, but not high, ambient GABA concentration changed both the input resistance and recruitment threshold as a function of motoneuron size, it was inferred that two different types of GABA<sub>A</sub> receptors are involved in these responses. We propose that effects of GABA 100  $\mu$ M were mainly due to the activation of low-affinity GABA<sub>A</sub> receptor (i.e. those involved in the fast postsynaptic events) while effects observed during gabazine exposition were due to the blockage of high-affinity GABA<sub>A</sub> receptors, which are located extrasynaptically.
9. According to the reported results, glutamate acts as modulator of the cell excitability by modification in active membrane properties, whereas tonic GABA current acts upon passive membrane properties. Both glutamate and tonic GABA<sub>A</sub> mediated currents increased their effects upon recruitment threshold and *I-F* gain with increasing motoneuron size.
10. In functional terms, we suggest that glutamate, through metabotropic glutamate receptors, and GABA, through high affinity GABA<sub>A</sub> receptors, act in an orchestrated manner to reinforce the effect of the activation of receptors mediating transient postsynaptic effects. Thus, an increase in the extracellular glutamate concentration is accompanied by a decrease in the ambient GABA. These modifications can act to modulate cell excitability and to refine motoneuron firing rate allowing ocular fixations, even in eccentric positions of the eye in the orbit, and accurate saccadic eye movement of high velocity.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



Anderson TJ, MacAskill MR (2013) Eye movements in patients with neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 9: 74-85.

Angelaki DE, Cullen KE (2008) Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu Rev Neurosci.* 31: 125-150.

Angelaki DE, Hess BJ (2005) Self-motion-induced eye movements: effects on visual acuity and navigation. *Nat Rev Neurosci.* 6: 966-976.

Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 29: 83-120.

Ahlfeld J, Mustari M, Horn AK (2011) Sources of calretinin inputs to motoneurons of extraocular muscles involved in upgaze. *Ann N Y Acad Sci.* 1233: 91-99.

Baker R, Evinger C, McCrea RA (1981) Some thoughts about the three neurons in the vestibular ocular reflex. *Ann N Y Acad Sci.* 374: 171-188.

Barmack NH (1977) Recruitment and suprathreshold frequency modulation of single extraocular muscle fibers in the rabbit. *J Neurophysiol.* 40: 779-790.

Bianchi L, Ballini C, Colivicchi MA, Della Corte L, Giovannini MG, Pepeu G (2003) Investigation on acetylcholine, aspartate, glutamate and GABA extracellular levels from ventral hippocampus during repeated exploratory activity in the rat. *Neurochem Res.* 28: 565-573.

Binder MD, Heckman CJ, Powers RK (1993) How different afferent inputs control motoneuron discharge and the output of the motoneuron pool. *Curr Opin Neurobiol.* 3: 1028-1034.

Binder MD1, Robinson FR, Powers RK (1998) Distribution of effective synaptic currents in cat triceps surae motoneurons. VI. Contralateral pyramidal tract. *J Neurophysiol.* 80: 241-248.

Blackshaw LA, Page AJ, Young RL (2011) Metabotropic glutamate receptors as novel therapeutic targets on visceral sensory pathways. *Front Neurosci.* 5: 40.

- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M (1996) Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J Physiol.* 497: 753-759.
- Brizzi L, Meunier C, Zytnicki D, Donnet M, Hansel D, Lamotte D'Incamps B, Van Vreeswijk C (2004) How shunting inhibition affects the discharge of lumbar motoneurons: a dynamic clamp study in anaesthetized cats. *J Physiol.* 558: 671-683.
- Broussard DM, DeCharms RC, Lisberg SG (1995) Inputs from the ipsilateral and contralateral vestibular apparatus to behaviorally characterized abducens neurons in rhesus monkeys. *J Neurophysiol.* 74: 2445-2459.
- Büttner-Ennever JA (2006) The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog Brain Res.* 151: 95-125.
- Büttner-Ennever JA, Büttner U (1978) A cell group associated with vertical eye movements in the rostral mesencephalic reticular formation of the monkey. *Brain Res.* 151: 31-47.
- Büttner-Ennever JA, Büttner U, Cohen B, Baumgartner G (1982) Vertical gaze paralysis and the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus. *Brain.* 105: 125-149.
- Buttner-Ennever JA, Horn AK, Graf W, Ugolini G (2002) Modern concepts of brainstem anatomy: from extraocular motoneurons to proprioceptive pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 956: 75-84.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK, Scherberger H, D'Ascanio P (2001) Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J Comp Neurol.* 438: 318-335.
- Carlier E, Sourdet V, Boudkkazi S, Déglise P, Ankri N, Fronzaroli-Molinieres L, Debanne D (2006) Metabotropic glutamate receptor subtype 1 regulates sodium currents in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 577: 141-154.
- Carpenter MB, Periera AB, Guha N (1992) Immunocytochemistry of oculomotor afferents in the squirrel monkey (*Saimirisciureus*). *J Hirnforsch.* 33: 151-167.

Carrascal L, Luque MA, Sobrino V, Torres B, Nunez-Abades P (2010) Postnatal development enhances the effects of cholinergic inputs on recruitment threshold and firing rate of rat oculomotor nucleus motoneurons. *Neuroscience* 171: 613-621.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Cameron WE, Torres B, Nunez-Abades PA (2005) Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Res Brain Res Rev.* 49: 377-387.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Núñez-Abades P, Torres B (2006) Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience* 140: 1223-1237.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Torres B, Nunez-Abades P (2009) Changes in somato dendritic morphometry of rat oculomotor nucleus motoneurons during postnatal development. *J Comp Neurol.* 514: 189-202.

Carrascal L, Nieto-González JL, Torres B, Nunez-Abades P (2011) Diminution of voltage threshold plays a key role in determining recruitment of oculomotor nucleus motoneurons during postnatal development. *PLoS One.* 6: e28748.

Castro A, Aguilar J, Andrés C, Felix R, Delgado-Lezama R (2011) GABAA receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord. *Neuroscience* 192: 74-80.

Chadderton P, Margrie TW, Häusser M (2004) Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature.* 428: 856-860.

Chance FS, Abbott LF, Reyes AD (2002) Gain modulation from background synaptic input. *Neuron.* 35: 773-782.

Chapman RJ, Issberger JP, Sillar KT (2008) Group I mGluRs increase locomotor network excitability in *Xenopus* tadpoles via presynaptic inhibition of glycinergic neurotransmission. *Eur J Neurosci.* 28: 903-913.

Chelazzi L, Rossi F, Tempia F, Ghirardi M, Strata P (1989) Saccadic Eye Movements and Gaze Holding in the Head-Restrained Pigmented Rat. *Eur J Neurosci.* 1: 639-646.

Che Ngwa E, Zeeh C, Messoudi A, Büttner-Ennever JA, Horn AK (2014) Delineation of motoneuron subgroups supplying individual eye muscles in the human oculomotor nucleus. *Front Neuroanat.* 8: 2.doi: 10.3389.

Chesnoy-Marchais D (2013) Bicuculline- and neurosteroid-sensitive tonic chloride current in rat hypoglossal motoneurons and atypical dual effect of SR95531. *Eur J Neurosci.* 37: 366-379.

Chevallier A, Mialot A, Petit JM, Fernandez-Salguero P, Barouki R, Coumoul X, Beraneck M (2013) Oculomotor deficits in aryl hydrocarbon receptor null mouse. *PLoS One* 8: e53520.

Cohen B, Komatsuzaki A (1972) Eye movements induced by stimulation of the pontine reticular formation: evidence for integration in oculomotor pathways. *Exp Neurol.* 36: 101-117.

Cope TC, Sokoloff AJ (1999) Orderly recruitment among motoneurons supplying different muscles. *J Physiol Paris.* 93: 81-85.

Cosgrove KE, Galván EJ, Barrionuevo G, Meriney SD (2011) mGluRs modulate strength and timing of excitatory transmission in hippocampal area CA3. *Mol Neurobiol.* 44: 93-101.

Cullen KE (2012) The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends Neurosci.* 35: 185-196.

Cullen KE, Van Horn MR (2011) The neural control of fast vs. slow vergence eye movements. *Eur J Neurosci.* 33: 2147-2154.

Dai Y, Jones KE, Fedirchuk B, McCrea DA, Jordan LM (2002) A modelling study of locomotion-induced hyperpolarization of voltage threshold in cat lumbar motoneurons. *J Physiol.* 544: 521-536.

Davis-Lopez de Carrizosa MA (2010) Neurotrophic regulation of the discharge properties and synaptic afferences on axotomized abducens motoneurons. Doctoral thesis. University of Seville.

Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Miller JM, de la Cruz RR, Pastor AM (2011) Dual encoding of muscle tension and eye position by abducens motoneurons. *J Neurosci.* 31: 2271-2279.

Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Tena JJ, Benítez-Temiño B, Pecero ML, Morcuende SR, de la Cruz RR, Pastor AM (2009) Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci.* 29: 575-587.

de la Cruz RR, Escudero M, Delgado-García JM (1989) Behaviour of Medial Rectus Motoneurons in the Alert Cat. *Eur J Neurosci.* 1: 288-295.

de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM (1992) Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience.* 51: 911-929.

de Jeu M, De Zeeuw CI (2012) Video-oculography in mice. *J Vis Exp.* 19: e3971.

Del Negro CA, Chandler SH (1998) Regulation of intrinsic and synaptic properties of neonatal rat trigeminal motoneurons by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 18: 9216-9226.

Dean P (1997) Simulated recruitment of medial rectus motoneurons by abducens internuclear neurons: synaptic specificity vs. intrinsic motoneuron properties. *J Neurophysiol.* 78: 1531-1549.

Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R (1986) Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--I. Motoneurons. *Neuroscience* 17: 929-952.

Demêmes D, Raymond J (1982) Radioautographic identification of [3H] glutamic acid labeled nerve endings in the cat oculomotor nucleus. *Brain Res.* 231: 433-437.

Demer JL, Clark RA, Crane BT, Tian JR, Narasimhan A, Karim S (2008) Functional anatomy of the extraocular muscles during vergence. *Prog Brain Res.* 171: 21-28.

Demer JL, Oh SY, Poukens V (2000) Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 1280-1290.

Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW, Prusky GT (2005) Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Vis Neurosci.* 22: 677-684.

Duguid I, Branco T, London M, Chadderton P, Häusser M (2012) Tonic inhibition enhances fidelity of sensory information transmission in the cerebellar cortex. *J Neurosci.* 32: 11132-11143.

Duque D, Malmierca MS, Caspary DM (2014) Modulation of stimulus-specific adaptation by GABA(A) receptor activation or blockade in the medial geniculate body of the anaesthetized rat. *J Physiol.* 592: 729-743

Durand J (1991) NMDA Actions on rat abducens motoneurons. *Eur J Neurosci.* 3: 621-633.

Durand J (1993) Synaptic excitation triggers oscillations during NMDA receptor activation in rat abducens motoneurons. *Eur J Neurosci.* 5: 1389-1397.

Durand J, Engberg I, Tyc-Dumont S (1987) L-glutamate and N-methyl-D-aspartate actions on membrane potential and conductance of cat abducens motoneurons. *NeurosciLett.* 79: 295-300.

Eberhorn AC, Ardeleanu P, Büttner-Ennever JA, Horn AK (2005) Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol.* 491: 352-366.

Eberhorn AC, Büttner-Ennever JA, Horn AK (2006) Identification of motoneurons supplying multiply- or singly-innervated extraocular muscle fibers in the rat. *Neuroscience* 137: 891-903.

Euler T, Wässle H (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol.* 361: 461-478.

Evinger C (1988) Extraocular motor nuclei: location, morphology and afferents. En "Neuronatomy of the oculomotor system" (Büttner-Ennever, ed.) Elsevier Págs. 81-118.

Fagni L (2008) The metabotropic glutamate receptors. En "Cellular and molecular neurophysiology" (Hammond C, ed.) Academic Press. págs. 256-270.



Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6: 215-229.

Faulstich M, van Alphen AM, Luo C, du Lac S, De Zeeuw CI (2006) Oculomotor plasticity during vestibular compensation does not depend on cerebellar LTD. *J Neurophysiol.* 96: 1187-1195.

Felder E, Bogdanovich S, Rubinstein NA, Khurana TS (2005) Structural details of rat extraocular muscles and three-dimensional reconstruction of the rat inferior rectus muscle and muscle-pulley interface. *Vision Res.* 45: 1945-1955.

Fernández de Sevilla D, Rodrigo-Angulo M, Nuñez A, Buño W (2006) Cholinergic modulation of synaptic transmission and postsynaptic excitability in the rat gracilis dorsal column nucleus. *J Neurosci.* 26: 4015-4025.

Fox MA, Tapia JC, Kasthuri N, Lichtman JW (2011) Delayed synapse elimination in mouse levator palpebrae superioris muscle. *J Comp Neurol.* 519: 2907-2921.

Fraterman S, Zeiger U, Khurana TS, Wilm M, Rubinstein NA (2007) Quantitative proteomics profiling of sarcomere associated proteins in limb and extraocular muscle allotypes. *Mol Cell Proteomics.* 6: 728-737.

Frens MA, Donchin O (2009) Forward models and state estimation in compensatory eye movements. *Front Cell Neurosci.* 3: 13.

Fuchs AF, Kaneko CR, Scudder CA (1985) Brainstem control of saccadic eye movements. *Annu Rev Neurosci.* 8: 307-337.

Fuchs AF, Scudder CA, Kaneko CR (1988) Discharge patterns and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus. *J Neurophysiol.* 60: 1874-1895.

Fuller JH (1985) Eye and head movements in the pigmented rat. *Vision Res.* 25: 1121-1128.

Fuller PI, Reddrop C, Rodger J, Bellingham MC, Phillips JK (2006) Differential expression of the NMDA NR2B receptor subunit in motoneuron populations susceptible and resistant to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 399: 157-161.

Fukushima K, Kaneko CR (1995) Vestibular integrators in the oculomotor system. *Neurosci Res.* 22: 249-258.

Fukushima K, Kaneko CR, Fuchs AF (1992) The neuronal substrate of integration in the oculomotor system. *Prog Neurobiol.* 39: 609-639.

Gamlin PD, Miller JM (2012) Extraocular muscle motor units characterized by spike-triggered averaging in alert monkey. *J Neurosci Methods.* 204: 159-167.

Gao H, Smith BN (2010) Tonic GABAA receptor-mediated inhibition in the rat dorsal motor nucleus of the vagus. *J Neurophysiol.* 103: 904-914.

Glimcher PW (2003) Eye movements. En "Fundamental Neuroscience" (Squire, Bloom, McConnell, Roberts, Spitzer, Zigmond, eds.) págs. 873-896.

Glykys J, Mody I (2007) Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron.* 56: 763-770.

Goldberg SJ, Meredith MA, Shall MS (1998) Extraocular motor unit and whole-muscle responses in the lateral rectus muscle of the squirrel monkey. *J Neurosci.* 18: 10629-1039.

Goldstein HP, Robinson DA (1986) Hysteresis and slow drift in abducens unit activity. *J Neurophysiol.* 55: 1044-1056.

Gómez C, Torres B, Jimenez-Ridruejo G, Delgado-García JM (1986) A quantitative analysis of abducens motoneuron behavior during saccadic eye movements in the alert cat. *Neurosci Res.* 3: 345-50.

González-Forero D, Alvarez FJ, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM (2002) Influence of afferent synaptic innervation on the discharge variability of cat abducens motoneurones. *541: 283-299.*

Graf W, Gerrits N, Yatim-Dhiba N, Ugolini G (2002) Mapping the oculomotor system: the power of transneuronallabelling with rabies virus. *Eur J Neurosci.* 15: 1557-1562.

Hamann M, Rossi DJ, Attwell D (2002) Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron.* 33: 625-633.

Hammond C (2008) The ionotropic glutamate receptors. En "Cellular and molecular neurophysiology" (Hammond C, ed.) Academic Press. págs. 209-231.

Hassel B, Dingledine R (2006) Glutamate. En "Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects" (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds.). Academic Press, págs.267-290.

Hayhoe M, Ballard D (2005) Eye movements in natural behavior. Trends Cogn Sci. 9: 188-194.

Hazel TR, Sklavos SG, Dean P (2002) Estimation of premotor synaptic drives to simulated abducens motoneurons for control of eye position. Exp Brain Res. 146: 184-196.

Heckman CJ, Binder MD (1988) Analysis of effective synaptic currents generated by homonymous Ia afferent fibers in motoneurons of the cat. J Neurophysiol. 60: 1946-1966.

Heckman CJ, Binder MD (1991) Analysis of Ia-inhibitory synaptic input to cat spinal motoneurons evoked by vibration of antagonist muscles. J Neurophysiol. 66: 1888-1893.

Heckman CJ, Binder MD (1993a) Computer simulations of motoneuron firing rate modulation. J Neurophysiol. 69: 1005-1008.

Heckman CJ, Binder MD (1993b) Computer simulations of the effects of different synaptic input systems on motor unit recruitment. J Neurophysiol. 70: 1827-1840.

Heckman CJ, Lee RH, Brownstone RM (2003) Hyperexcitable dendrites in motoneurons and their neuromodulatory control during motor behavior. Trends Neurosci. 26: 688–695.

Hellström J, Oliveira AL, Meister B, Cullheim S (2003) Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. J Comp Neurol. 460: 476-486.

Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) Functional significance of cell size in spinal motoneurons. J Neurophysiol 28: 560-580.

Hess BJ, Savio T, Strata P. (1988) Dynamic characteristics of optokinetically controlled eye movements following inferior olive lesions in the brown rat. J Physiol. 397: 349-70.

Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci.* 30: 11917-11125.

Highstein SM, Holstein GR (2006) The anatomy of the vestibular nuclei. *Prog Brain Res.* 151: 157-203.

Horn AK (2006) The reticular formation. *Prog Brain Res.* 151: 127-155.

Horn AK, Adamczyk (2012) Reticular formation: eye movements, gaze and blinks. En "The human nervous system" (Mai JK, Paxinos G, eds.). Elsevier, págs. 330-367.

Horn AK, Büttner-Ennever JA (1998) Premotor neurons for vertical eye movements in the rostral mesencephalon of monkey and human: histologic identification by parvalbumin immunostaining. *J Comp Neurol.* 392: 413-427.

Horn AK, Eberhorn A, Härtig W, Ardeleanu P, Messoudi A, Büttner-Ennever JA (2008) Periocular motor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol.* 507: 1317-1335.

Horn AK, Helmchen C, Wahle P (2003) GABAergic neurons in the rostral mesencephalon of the macaque monkey that control vertical eye movements. *Ann N Y Acad Sci.* 1004: 19-28.

Horn AK, Leigh RJ (2011) The anatomy and physiology of the ocular motor system. *Handb Clin Neurol.* 102: 21-69.

Hübner P, Lim R, Brichta AM, Migliaccio AA (2013) Glycine receptor deficiency and its effect on the horizontal vestibulo-ocular reflex: a study on the SPD1J mouse. *J Assoc Res Otolaryngol.* 14: 249-259.

Ichikawa T, Shimizu T (1998) Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res.* 779: 96-103.

Ingham NJ, McAlpine D (2005) GABAergic inhibition controls neural gain in inferior colliculus neurons sensitive to interaural time differences. *J Neurosci.* 25: 6187-6198.

- Iwagaki N, Miles GB (2011) Activation of group I metabotropic glutamate receptors modulates locomotor-related motoneuron output in mice. *J Neurophysiol.* 105: 2108-2120.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.* 9: 331-343.
- Jones MS, Ariel M (2008) Morphology, intrinsic membrane properties, and rotation-evoked responses of trochlear motoneurons in the turtle. *J Neurophysiol.* 99: 1187-1200.
- Judge SJ, Cumming BG (1986) Neurons in the monkey midbrain with activity related to vergence eye movement and accommodation. *J Neurophysiol.* 55: 915-930.
- Khanna S, Porter JD (2001) Evidence for rectus extraocular muscle pulleys in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 1986-1992.
- Kennard, C. (2011). Disorders of higher gaze control. *Handb Clin Neurol.* 102, 379-402.
- Kernell D (1965) Synaptic influence on the repetitive activity elicited in cat lumbosacral motoneurons by long-lasting injected currents. *Acta Physiol Scand* 63: 409-410.
- Kernell D, Bakels R, Copray JC (1999) Discharge properties of motoneurons: how are they matched to the properties and use of their muscle units? *J Physiol Paris.* 93: 87-96.
- Kersanté F, Rowley SC, Pavlov I, Gutiérrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul JM, Walker MC, Linthorst AC (2013) A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J Physiol.* 591: 2429-2441.
- Kevetter GA, Hoffman RD (1991) Excitatory amino acid immunoreactivity in vestibulo-ocular neurons in gerbils. *Brain Res.* 554: 348-351.
- Kono R, Poukens V, Demer JL (2005) Superior oblique muscle layers in monkeys and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 2790-2799.
- Kowler E (2011) Eye movements: the past 25 years. *Vision Res.* 51: 1457-1483.

Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A & Walker MC (2005) Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol.* 87: 33-46.

Lahjouji F, Barbe A, Chazal G, Bras H (1996) Evidence for colocalization of GABA and glycine in afferents to retrogradely labelled rat abducens motoneurons. *Neurosci Lett.* 206: 161-164.

Laslo P, Lipski J, Funk GD (2001a) Differential expression of Group I metabotropic glutamate receptors in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *Neuroreport.* 12: 1903-1908.

Laslo P, Lipski J, Nicholson LF, Miles GB, Funk GD (2001b) GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 169: 461-471.

Legg C, Lambert S (1990) Distance estimation in the hooded rat: experimental evidence for the role of motion cues. *Behav Brain Res.* 41: 11-20.

Leigh RJ, Zee DS (2006) *The Neurology of Eye Movements.* Oxford University Press.

Lorenzo LE, Russier M, Barbe A, Fritschy JM, Bras H (2007) Differential organization of gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors in the somatic and dendritic compartments of rat abducens motoneurons. *J Comp Neurol.* 504: 112-26.

Mann EO, Paulsen O (2007) Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* 30: 343-349.

Marchetti C, Taccola G, Nistri A (2005) Activation of group I metabotropic glutamate receptors depresses recurrent inhibition of motoneurons in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Exp Brain Res.* 164: 406-410.

Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI (1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 405: 299-321.

Mayer ML (2005) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 282-288.

May PJ, Reiner AJ, Ryabinin AE (2008) Comparison of the distributions of urocortin-containing and cholinergic neurons in the periculomotor midbrain of the cat and macaque. *J Comp Neurol.* 507: 1300-1316.

Mays LE (1984) Neural control of vergence eye movements: convergence and divergence neurons in midbrain. *J Neurophysiol.* 51: 1091-1108.

McCrea RA, Horn AK (2006) Nucleus prepositus. *Prog Brain Res.* 151: 205-230.

McCrea RA, Strassman A, Highstein SM (1987) Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the vertical vestibulo-ocular reflexes of the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 264: 571-594.

McFarland JL, Fuchs AF (1992) Discharge patterns in nucleus prepositus hypoglossi and adjacent medial vestibular nucleus during horizontal eye movement in behaving macaques. *J Neurophysiol.* 68: 319-332.

McElvain LE, Bagnall MW, Sakatos A, du Lac S (2010) Bidirectional plasticity gated by hyperpolarization controls the gain of postsynaptic firing responses at central vestibular nerve synapses. *Neuron.* 68: 763-775.

Mendell LM (2005) The size principle: a rule describing the recruitment of motoneurons. *J Neurophysiol.* 93: 3024-3026.

Miller JM (2007) Understanding and misunderstanding extraocular muscle pulleys. *J Vis.* 7: 10.1-15.

Mitchell SJ, Silver RA (2003) Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron.* 38: 433-445.

Moncman CL, Andrade ME, Andrade FH (2011) Postnatal changes in the developing rat extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 3962-3969.

Moncman CL, Andrade ME, McCool AA, McMullen CA, Andrade FH (2013) Development transitions of thin filament proteins in rat extraocular muscles. *Exp Cell Res.* 319: 23-31.

- Mortensen M, Kristiansen U, Ebert B, Frølund B, Krogsgaard-Larsen P, Smart TG (2004) Activation of single heteromeric GABA(A) receptor ion channels by full and partial agonists. *J Physiol.* 557: 389-413.
- Moschovakis AK, Scudder CA, Highstein SM (1996) The microscopic anatomy and physiology of the mammalian saccadic system. *Prog Neurobiol.* 50: 133-254.
- Moschovakis AK, Scudder CA, Highstein SM (1991a) Structure of the primate oculomotor burst generator. I. Medium-lead burst neurons with upward on-directions. *J Neurophysiol.* 65: 203-217.
- Moschovakis AK, Scudder CA, Highstein SM, Warren JD (1991b) Structure of the primate oculomotor burst generator. II. Medium-lead burst neurons with downward on-directions. *J Neurophysiol.* 65: 218-229.
- Navarro-López Jde D, Alvarado JC, Márquez-Ruiz J, Escudero M, Delgado-García JM, Yajeya J (2004) A cholinergic synaptically triggered event participates in the generation of persistent activity necessary for eye fixation. *J Neurosci.* 24: 5109-5118.
- Nelson JS, Goldberg SJ, McClung JR (1986) Motoneuron electrophysiological and muscle contractile properties of superior oblique motor units in cat. *J Neurophysiol.* 55: 715-726.
- Nguyen LT, Baker R, Spencer RF (1999) Abducens internuclear and ascending tract of deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: synaptic organization. *J Comp Neurol.* 405: 141-159.
- Nguyen LT, Spencer RF (1999) Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: neurotransmitters. *J Comp Neurol.* 411: 73-86.
- Nieto-Gonzalez JL, Carrascal L, Nunez-Abades P, Torres B (2009) Muscarinic modulation of recruitment threshold and firing rate in rat oculomotor nucleus motoneurons. *J Neurophysiol.* 101: 100-111.
- Nieto-Gonzalez JL, Carrascal L, Nunez-Abades P, Torres B (2007) Phasic and tonic firing properties in rat oculomotor nucleus motoneurons, studied in vitro. *Eur J Neurosci.* 25: 2682-2696.



- Numata JM, van Brederode JF, Berger AJ (2012) Lack of an endogenous GABAA receptor-mediated tonic current in hypoglossal motoneurons. *J Physiol.* 590: 2965-76.
- Nusser Z, Mody I (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol.* 87: 2624-2628.
- Nusser Z, Roberts JD, Baude A, Richards JG, Somogyi P (1995) Relative densities of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors on cerebellar granule cells as determined by a quantitative immunogold method. *J Neurosci.* 15: 2948-2960.
- Orban de Xivry JJ, Lefèvre P (2007) Saccades and pursuit: two outcomes of a single sensorimotor process. *J Physiol.* 584: 11-23.
- Ortinski PI, Turner JR, Barberis A, Motamedi G, Yasuda RP, Wolfe BB, Kellar KJ, Vicini S (2006) Deletion of the GABA(A) receptor alpha1 subunit increases tonic GABA(A) receptor current: a role for GABA uptake transporters. *J Neurosci.* 26: 9323-31.
- Ouardouz M, Durand J (1994) Involvement of AMPA receptors in trigeminal post-synaptic potentials recorded in rat abducens motoneurons in vivo. *Eur J Neurosci.* 6: 1662-1668.
- Park JB, Skalska S, Stern JE (2006) Characterization of a novel tonic gamma-aminobutyric acidA receptor-mediated inhibition in magnocellular neurosecretory neurons and its modulation by glia. *Endocrinology.* 147: 3746-3760.
- Partsalis AM, Zhang Y, Highstein SM (1995) Dorsal Y group in the squirrel monkey. I. Neuronal responses during rapid and long-term modifications of the vertical VOR. *J Neurophysiol.* 73: 615-631.
- Pastor AM, Gonzalez-Forero D (2003) Recruitment order of cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *J Neurophysiol.* 90: 2240-2252.
- Pastor AM, Torres B, Delgado-Garcia JM, Baker R (1991) Discharge characteristics of medial rectus and abducens motoneurons in the goldfish. *J Neurophysiol.* 66: 2125-2140.
- Pavlov I, Savtchenko LP, Kullmann DM, Semyanov A, Walker MC (2009) Outwardly rectifying tonically active GABAA receptors in pyramidal cells modulate neuronal offset, not gain. *J Neurosci.* 29: 15341-1550.

- Petrini EM, Marchionni I, Zacchi P, Sieghart W, Cherubini E (2004) Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 279: 45833-45843.
- Piotrkiewicz, M (1999) An influence of afterhyperpolarization on the pattern of motoneuronal rhythmic activity. *J Physiol Paris* 93: 125-133.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science.* 293: 1159-1163.
- Powers RK, Binder MD (2000) Relationship between the time course of the afterhyperpolarization and discharge variability in cat spinal motoneurons. *J Physiol* 528: 131-150.
- Powers RK, Robinson FR, Konodi MA, Binder MD (1993) Distribution of rubrospinal synaptic input to cat triceps surae motoneurons. *J Neurophysiol.* 70: 1460-1468.
- Rashed RM, El-Alfy SH (2012) Ultrastructural organization of muscle fiber types and their distribution in the rat superior rectus extraocular muscle. *Acta Histochem.* 114: 217-225.
- Rashed RM, El-Alfy SH, Mohamed IK (2010) Histochemical analysis of muscle fiber types of rat superior rectus extraocular muscle. *Acta Histochem.* 112: 536-545.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev.* 80: 767-852.
- Richerson GB, Wu Y (2003) Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J Neurophysiol.* 90: 1363-1374.
- Robinson DA (1970) Oculomotor unit behavior in the monkey. *J Neurophysiol.* 33: 393-403.
- Robinson DA (1964) The mechanics of human saccadic eye movement. *J Physiol.* 174: 245-264.
- Robinson DA (1981) The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu Rev Neurosci.* 4: 463-503.

Rothman JS, Cathala L, Steuber V, Silver RA (2009) Synaptic depression enables neuronal gain control. *Nature* 457: 1015-1018.

Ruiz A, Durand J (1999) Modulation of kainate-induced responses by pentobarbitone and GYKI-53784 in rat abducens motoneurons in vivo. *Brain Res.* 818: 421-430.

Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullmann DM (2003) GABAA receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron.* 39: 961-973.

Russier M, Kopysova IL, Ankri N, Ferrand N, Debanne D (2002) GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol.* 541: 123-137.

Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1995) Spike frequency adaptation studied in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol.* 73: 1799-1810.

Schütz AC, Braun DI, Gegenfurtner KR (2011) Eye movements and perception: a selective review. *J Vis.* 11: 9 (1-30).

Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci.* 25: 10016-10024.

Scudder CA, Fuchs AF (1992) Physiological and behavioral identification of vestibular nucleus neurons mediating the horizontal vestibuloocular reflex in trained rhesus monkeys. *J Neurophysiol.* 68: 244-264.

Scudder CA, Fuchs AF, Langer TP (1988) Characteristics and functional identification of saccadic inhibitory burst neurons in the alert monkey. *J Neurophysiol.* 59: 1430-1454.

Scudder CA, Kaneko CS, Fuchs AF (2002) The brainstem burst generator for saccadic eye movements: a modern synthesis. *Exp Brain Res.* 142: 439-462.

Sebe JY, van Brederode JF, Berger AJ (2006) Inhibitory synaptic transmission governs inspiratory motoneuron synchronization. *J Neurophysiol.* 96: 391-403.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003) GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci.* 6: 484-490.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA<sub>A</sub> receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* 27: 262-269.

Shall MS, Dimitrova DM, Goldberg SJ (2003) Extraocular motor unit and whole-muscle contractile properties in the squirrel monkey. Summation of forces and fiber morphology. *Exp Brain Res.* 151: 338-345.

Shall MS, Goldberg SJ (1992) Extraocular motor units: type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationships. *Brain Res.* 587: 291-300.

Sharifullina E, Ostroumov K, Nistri A (2004) Activation of group I metabotropic glutamate receptors enhances efficacy of glutamatergic inputs to neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci.* 20: 1245-1254.

Siegel A, Sapru HN (2010) *Essential Neuroscience*. Lippincott Williams & Wilki.

Sparks DL. (2002) The brainstem control of saccadic eye movements. *Nat Rev Neurosci* 3: 952-964.

Spencer RF, Baker R (1992) GABA and glycine as inhibitory neurotransmitters in the vestibuloocular reflex. *Ann N Y Acad Sci.* 656: 602-611.

Spencer RF, Porter JD (2006) Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res.* 151: 43-80.

Spencer RF, Wang SF (1996) Immunohistochemical localization of neurotransmitters utilized by neurons in the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus (riMLF) that project to the oculomotor and trochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 366: 134-148.

Spencer RF, Wang SF, Baker R (1992) The pathways and functions of GABA in the oculomotor system. *Prog Brain Res.* 90: 307-331.

Spencer RF, Wenthold RJ, Baker R (1989) Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus. *J Neurosci.* 9: 2718-2736.

Stålberg E, Nandedkar SD, Sanders DB, Falck B (1996) Quantitative motor unit potential analysis. *J ClinNeurophysiol.* 13: 401-422.

Stahl JS (2008) Characteristics and applications of mouse eye movements. En "Eye, Retina and Visual System of the Mouse" (Chalupa LM and Williams RW, eds). Cambridge, MA: The MIT Press, págs 87-105.

Stahl JS (2004) Using eye movements to assess brain function in mice. *Vision Res.* 44: 3401-3410.

Stahl JS, James RA, Oommen BS, Hoebeek FE, De Zeeuw CI (2006) Eye movements of the murine P/Q calcium channel mutant tottering, and the impact of aging. *J Neurophysiol.* 95: 1588-1607.

Stahl JS, Simpson JI (1995) Dynamics of abducens nucleus neurons in the awake rabbit. *J Neurophysiol.* 73: 1383-1395.

Stahl JS, Thumser ZC (2012) Dynamics of abducens nucleus neurons in the awake mouse. *J Neurophysiol.* 108: 2509-2523.

Stahl JS, van Alphen AM, De Zeeuw CI (2000) A comparison of video and magnetic search coil recordings of mouse eye movements. *J Neurosci Methods.* 99: 101-110.

Stórustovu SI, Ebert B (2006) Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *J Pharmacol Exp Ther.* 316: 1351-1359.

Strassman A, Highstein SM, McCrea RA (1986a) Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. I. Excitatory burst neurons. *J Comp Neurol.* 249: 337-357.

Strassman A, Highstein SM, McCrea RA (1986b) Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. II. Inhibitory burst neurons. *J Comp Neurol.* 249: 358-380.

Sylvestre PA, Cullen KE (1999) Quantitative analysis of abducens neuron discharge dynamics during saccadic and slow eye movements. *J Neurophysiol.* 82: 2612-2632.

Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science.* 274: 594-597.

Tanaka S, Kawaguchi SY, Shioi G, Hirano T (2013) Long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission onto cerebellar Purkinje neurons contributes to adaptation of vestibulo-ocular reflex. *J Neurosci.* 33: 17209-17220.

Thier P, Ilg UJ (2005) The neural basis of smooth-pursuit eye movements. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 645-652.

Tilikete C, Pélisson D (2008) Ocular motor syndromes of the brainstem and cerebellum. *Curr Opin Neurol.* 21: 22-28.

Torres-Torrelo J, Rodríguez-Rosell D, Nunez-Abades P, Carrascal L, Torres B (2012) Glutamate modulates the firing rate in oculomotor nucleus motoneurons as a function of the recruitment threshold current. *J Physiol.* 590: 3113-3127

Ugolini G, Klam F, DoldanDans M, Dubayle D, Brandi AM, Büttner-Ennever J, Graf W (2006) Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: differences in monosynaptic input to "slow" and "fast" abducens motoneurons. *J Comp Neurol.* 498: 762-785.

Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1995) Repetitive firing properties of developing rat brainstem motoneurons. *J Physiol.* 486: 745-761.

Waldvogel HJ, Baer K, Eady E, Allen KL, Gilbert RT, Mohler H, Rees MI, Nicholson LF, Faull RL (2010) Differential localization of gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor subunits and gephyrin in the human pons, medulla oblongata and uppermost cervical segment of the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 518: 305-328.

Wallace DJ, Greenberg DS, Sawinski J, Rulla S, Notaro G, Kerr JN (2013) Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion. *Nature*. 498: 65-69.

Walker MC, Semyanov A (2008) Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ*. 44: 29-48.

Wang SF, Spencer RF (1996a) Morphology and soma-dendritic distribution of synaptic endings from the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus (riMLF) on motoneurons in the oculomotor and trochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol*. 366: 149-162.

Wang SF, Spencer RF (1996b) Spatial organization of premotor neurons related to vertical upward and downward saccadic eye movements in the rostral interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus (riMLF) in the cat. *J Comp Neurol*. 366: 163-180.

Waxham MN (2013) Neurotransmitter receptors. En "Fundamental neuroscience" (Squire L, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC, eds.) Academic Press.

Wentzel PR, De Zeeuw CI, Holstege JC, Gerrits NM (1995) Inhibitory synaptic inputs to the oculomotor nucleus from vestibulo-ocular-reflex-related nuclei in the rabbit. *Neuroscience* 65: 161-174.

Westcott SL, Powers RK, Robinson FR, Binder MD (1995) Distribution of vestibulospinal synaptic input to cat triceps surae motoneurons. *Exp Brain Res*. 107: 1-8.

Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci*. 27: 321-328.

Ying HS, Fackelmann K, Messoudi A, Tang XF, Büttner-Ennever JA, Horn AK (2008) Neuronal signalling expression profiles of motoneurons supplying multiply or singly innervated extraocular muscle fibres in monkey. *Prog Brain Res*. 171: 13-16.

Young SR, Chuang SC, Wong RK (2004) Modulation of afterpotentials and firing pattern in guinea pig CA3 neurones by group I metabotropic glutamate receptors. *J Physiol*. 554: 371-385.

Zeeh C, Hess BJ, Horn AK (2013) Calretinin inputs are confined to motoneurons for upward eye movements in monkey. *J Comp Neurol*. 521: 3154-3166.

Zhang Y, Gamlin PD, Mays LE (1991) Antidromic identification of midbrain near response cells projecting to the oculomotor nucleus. *Exp Brain Res.* 84: 525-528.

Zhang Y, Mays LE, Gamlin PD (1992) Characteristics of near response cells projecting to the oculomotor nucleus. *J Neurophysiol.* 67: 944-960

Zhou Y, Liu D, Kaminski HJ (2010) Myosin heavy chain expression in mouse extraocular muscle: more complex than expected. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 6355-6363.

Zimmermann L, Morado-Díaz CJ, Davis-López de Carrizosa MA, de la Cruz RR, May PJ, Streicher J, Pastor ÁM, Blumer R (2013) Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *J Neurosci.* 33: 2784-2793.

Zoccolan D, Oertelt N, DiCarlo JJ, Cox DD (2009) A rodent model for the study of invariant visual object recognition. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 8748-8753.